

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ**

Διευθυντής: *Καθηγητής* Αναστάσιος Ε. Γερμενής

ΚΑΙ

**ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

Διευθυντής: *Καθηγητής* Κων/νος Ι. Γουργουλιάνης

---

**ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΩΝ *TLR2* ΚΑΙ *TLR4***  
**ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ Θ. ΜΕΡΕΝΤΙΤΗ**

Ιατρός

ΛΑΡΙΣΑ 2009

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Αναστάσιος Ε. Γερμενής** (επιβλέπων)

Καθηγητής Ανοσολογίας

**Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης**

Καθηγητής Πνευμονολογίας

**Ευθυμία Πετεινάκη**

Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Αναστάσιος Ε. Γερμενής**

Καθηγητής Ανοσολογίας

**Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης**

Καθηγητής Πνευμονολογίας

**Ευθυμία Πετεινάκη**

Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

**Λάζαρος Σακκάς**

Καθηγητής Παθολογίας – Ρευματολογίας

**Γεώργιος Χατζηγεωργίου**

Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας

**Ματθαίος Σπελέτας**

Επίκουρος Καθηγητής Ανοσολογίας

**Ζωή Δανιήλ**

Επίκουρη Καθηγήτρια Πνευμονολογίας

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	4
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ .....	6
ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	7
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	9
1. Κληρονομικότητα και ΧΑΠ.....	10
1.1. Οικογενής κατανομή.....	12
1.2. Πανγενωμικές μελέτες .....	13
1.3. Μελέτες συσχέτισης.....	17
1.3.1. Γονίδιο α <sub>1</sub> -αντιθρυψίνης .....	17
1.3.2. Γονίδια άλλων αντιπρωτεασών .....	19
1.3.3. Γονίδια μεταλλοπρωτεϊνών και ιστικών αναστολέων τους.....	20
1.3.4. Γονίδια ενζύμων εμπλεκόμενων στο οξειδωτικό stress .....	21
1.3.5. Γονίδια κυτταροκινών.....	24
1.3.6. Άλλα γονίδια .....	28
1.3.7. Αστάθεια μικροδορυφορικών DNA-περιοχών.....	29
2. TLRs .....	29
2.1. Δομή .....	31
2.2. Κυτταρική κατανομή και μεμβρανική έκφραση.....	32
2.3. Σηματοδότηση .....	34
2.4. TLR4 και TLR2 .....	36
3. Γενετική του TLR4 .....	38
4. Γενετική του TLR2 .....	48
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	52
ΥΛΙΚΟ.....	53
ΜΕΘΟΔΟΙ.....	55
1. Απομόνωση DNA.....	55
2. Ανίχνευση των πολυμορφισμών Asp299Gly και Thr399Ile του TLR4 .....	55
2.1. PCR.....	55
2.2. Πέψη των προϊόντων PCR με χρήση ενζύμων περιορισμού .....	57
3. Ανίχνευση του πολυμορφισμού TLR2-R753Q .....	59
3.1. PCR-RFLP.....	59
3.2. Allele Specific-PCR .....	60
4. Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων .....	62
5. Στατιστική ανάλυση.....	63
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	64
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	70
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	77
ABSTRACT .....	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	79

## Συντομογραφίες

---

- AP-1** (activator protein-1) = πρωτεΐνη ενεργοποίησης-1
- APCs** (antigen presenting cells) = αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
- CARD** (caspase recruitment domain) = περιοχή προσέλκυσης κασπασών
- CpG** (cytosine-phosphate-guanosine) = δινουκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανοσίνης
- CT** (computed tomography) = αξονική τομογραφία
- DAMPs** (damage-associated molecular patterns) = μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με τη βλάβη
- DC** (dendritic cell) = δενδριτικό κύτταρο
- DNA** (deoxyribonucleic acid) = δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
- EDTA** (ethylenediaminetetraacetic acid) = αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
- FEF25-75%** (forced expiratory flow during the middle half of the FVC) = μέση βία εκπνεόμενη ροή
- FEV<sub>1</sub>** (forced expiratory volume at one second) = βία εκπνεόμενο όγκο σε ένα δευτερόλεπτο
- FVC** (forced vital capacity) = βία εκπνεόμενη ζωτική χωρητικότητα
- Gc-globulin** (group-specific component globulin) = Gc-σφαιρίνη
- GSH** (glutathione) = αναχθείσα γλουταθιόνη
- GST** (glutathione S-transferase) = τρανσφεράση της S-γλουταθιόνης
- HLA** (human leukocyte antigen) = ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο
- HMOX1** (heme oxygenase-1) = οξυγενάση-1 της αίμης
- IFN** (interferon) = ιντερφερόνη
- IL** (interleukin) = ιντερλευκίνη
- IRF3** (IFN regulatory factor 3) = ρυθμιστικός παράγοντας 3 της ιντερφερόνης
- IkB-α** (inhibitor kappa B-alpha) = αναστολέας κB-α
- JNK** (c-Jun amino-terminal kinase) = Jun-κινάση
- LBP** (LPS-binding protein) = πρωτεΐνη συνδέουσα LPS
- LOD** (logarithm of the odds favoring genetic linkage) = λογάριθμος πιθανοφάνειας γενετικής σύνδεσης
- LPS** (lipopolysaccharide) = λιποπολυσακχαρίτες
- LRR** (leucine-rich repeat) = επανάληψη πλούσια σε λευκίνη
- MD-2** (myeloid differentiation 2) = μυελικής διαφοροποίησης 2
- mEPH** (microsomal epoxide hydrolase) = μικροσωματική εποξειδική υδρολάση
- MHC** (major histocompatibility complex) = μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
- MMP** (matrix metalloproteinases) = μεταλλοπρωτεϊνάσες στρώματος
- MSI** (microsatellite DNA instability) = αστάθεια των μικροδορυφορικών DNA-περιοχών
- NF-κB** (nuclear factor-kappa B) = πυρηνικός παράγοντας-κB
- NK-cells** (natural killer cells) = φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα
- PAMPs** (pathogen-associated molecular patterns) = μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με την παθογονικότητα
- PBMCs** (peripheral blood mononuclear cells) = περιφερικά μονοκύτταρα του αίματος
- PCR** (polymerase chain reaction) = αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- PEF** (peak expiratory flow) = μέγιστη εκπνευστική ροή
- Pi** (protease inhibitor) = αναστολέας πρωτεάσης
- PRRs** (pattern recognition receptors) = υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων

**RFLP** (restriction fragment length polymorphism) = πολυμορφισμός τμημάτων περιορισμένου μήκους

**ROS** (reactive oxygen species) = δραστικές ρίζες οξυγόνου

**SERPINE** (serine proteinase inhibitor) = αναστολέας πρωτεϊνών της σερίνης

**SNP** (single nucleotide polymorphism) = πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου

**STR** (short tandem repeat) = βραχείες επαναλήψεις διατεταγμένες στη σειρά

**TcR** (T cell receptor) = υποδοχέας του T-κυττάρου

**TGF- $\beta_1$**  (transforming growth factor- $\beta_1$ ) = αυξητικός παράγοντας της βλαστικής μεταμόρφωσης- $\beta_1$

**TIMP** (tissue inhibitor of metalloproteinases) = ιστικός αναστολέας των μεταλλοπρωτεϊνών στρώματος

**TIR domain** (Toll/IL-1 receptor domain) = πεδίο των υποδοχέων Toll/IL-1

**TLR** (Toll-like receptor) = ανάλογος των Toll υποδοχέας

**TNF** (tumor necrosis factor) = παράγοντας νέκρωσης των όγκων

**Tregs** (T-regulatory cells) = T-ρυθμιστικά κύτταρα

**VDBP** (vitamin D-binding protein) = πρωτεΐνη συνδέουσα τη βιταμίνη D

**VNTR** (variable number of tandem repeat) = μεταβλητός αριθμός επαναλήψεων διατεταγμένων στη σειρά

**wt** (wild type) = άγριος τύπος

**$\alpha_1$ AT** =  $\alpha_1$ -αντιθρυψίνη

**ΣΕΛ** = συστηματικός ερυθηματώδης λύκος

**ΧΑΠ** = χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Βασιλική Μερεντίτη του Θωμά  
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 4 Μαρτίου 1976  
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Αθήνα  
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Έγγαμη  
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: Καλαμάτα 3 – 42100 Τρίκαλα  
Τηλ.: 24310-28710 – Κινητό τηλέφωνο: 6937-355284  
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας – 41221 Λάρισα  
Τηλ.: 2410-560392  
E-mail: merentitivas@yahoo.com  
ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ: Αγγλικά (άριστα), Γαλλικά (καλά)

### ΣΠΟΥΔΕΣ – ΤΙΤΛΟΙ

2001 Πτυχίο Ιατρικής  
Σχολή Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

### ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ

2007 Ειδικευόμενη Ιατρός Ιατρικής Βιοπαθολογίας  
Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας  
2004-2005 Ειδικευόμενη Ιατρός Ιατρικής Βιοπαθολογίας  
Γενικό Νοσοκομείο Τρικάλων  
2002-2003 Υποχρεωτική Υπηρεσία Υπαίθρου  
Περιφερειακό Ιατρείο Βαλτινού, Τρίκαλα

### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. SPELETAS M, **MERENTITI V**, KOSTIKAS K, LIADAKI K, MINAS M, GOURGOULIANIS KI, GERMENIS AE. Increased risk for COPD development in smokers with *TLR4-T399I* polymorphism. *Clin Exp Immunol* (submitted)
2. SPELETAS M, KALALA F, MITROULIS I, PAPADOPOULOS V, **MERENTITI V**, GERMENIS AE, RITIS K. TLR2 and TLR4 polymorphisms in Familial Mediterranean Fever. *Hum Immunol* 2009 (doi:10.1016)

### ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1. ΚΑΡΑΝΙΚΑΣ Β, ΑΡΓΕΝΤΟΥ Ν, ΣΙΣΚΑ Ε, **MERENTITH B**, ΚΩΣΤΙΚΑΣ Κ, ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ Κ, ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΕ. mRNA έκφραση των DNA-μεθυλτρανσφερασών (DNMTs) σε λεμφοκύτταρα ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). 17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αλεξανδρούπολη 2008

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης της ΧΑΠ είναι το κάπνισμα. Ωστόσο, αν και η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών είναι καπνιστές, εκτιμάται ότι, τελικά, ποσοστό μικρότερο του 20% των συστηματικών καπνιστών αναπτύσσει τη νόσο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την πιθανή σημασία πρόσθετων περιβαλλοντικών ή και γενετικών παραγόντων στην παθογένεσή της. Ανάμεσα στους πρώτους περιλαμβάνονται και οι λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος που εκδηλώνονται κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής. Όσον αφορά τους δεύτερους, η αντίστοιχη έρευνα έχει επεκταθεί σε αρκετά γονίδια, αλλά εν πολλοίς τα αποτελέσματα παραμένουν αντικρουόμενα. Τα γονίδια που μελετώνται επιλέγονται, κατά κανόνα, στη βάση αποτελεσμάτων προηγούμενων μελετών γενετικής σύνδεσης με γνωστούς ή πιθανολογούμενους παθογενετικούς μηχανισμούς. Τα γονίδια των TLRs αποτελούν αντικείμενο ανάλογων μελετών γενετικής συσχέτισης με πληθώρα νοσημάτων. Μεταξύ άλλων συνεπειών, η παρουσία των πολυμορφισμών τους υποστηρίζεται ότι προδιαθέτει τους φορείς σε διάφορες λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων και πρώιμων λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος. Κατ' επέκταση, ενδεχομένως, τους καθιστά επιρρεπείς στην επακόλουθη βλαπτική επίδραση του καπνίσματος και στην ανάπτυξη ΧΑΠ. Με την παρούσα μελέτη αναζητήθηκαν συσχετίσεις της ανάπτυξης της ΧΑΠ και των διαφόρων φαινοτύπων της σε καπνιστές με την παρουσία τριών κοινών πολυμορφισμών των *TLRs*, των *TLR4-Asp299Gly*, *TLR4-Thr399Ile* και *TLR2-Arg753Gln*.

Το πειραματικό μέρος της μελέτης ολοκληρώθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα άτομα που αποτέλεσαν το υλικό της μελέτης προήλθαν από την Πνευμονολογική Κλινική του ίδιου Τμήματος. Εξετάστηκε, επιπλέον, αρχαικό γενετικό υλικό του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας.

Στο σημείο αυτό θέλω να εκφράσω τις ειλικρινείς, θερμές ευχαριστίες μου προς τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής παρακολούθησης της διδακτορικής διατριβής μου: τον επιβλέποντα Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας κ. Αναστάσιο Ε. Γερμενή, που καλλιέργησε το ενδιαφέρον μου για την Ανοσολογία και μου μετέδωσε την αγάπη για τη λεπτομέρεια και την ουσιαστική έρευνα· επιπλέον, με βοήθησε να ξεπεράσω αντιξοότητες και να ολοκληρώσω την προσπάθειά μου· τον Καθηγητή Πνευμονολογίας και Διευθυντή της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας κ. Κωνσταντίνο Ι. Γουργουλιάνη που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να υλοποιήσω το στόχο μου· την Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κα. Ευθυμία Πετεινάκη που στήριξε την προσπάθειά μου.

Σημαντική, επίσης, για την ολοκλήρωση της διατριβής μου ήταν η συμβολή του Επίκουρου Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κ. Ματθαίου Σπελέτα, τον οποίο και ευχαριστώ.

Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τους γιατρούς της Πνευμονολογικής Κλινικής, και ιδιαίτερα τον Λέκτορα Πνευμονολογίας κ. Κωνσταντίνο Κωστίκα, για την άψογη συνεργασία κατά τη διαδικασία επιλογής του υλικού της μελέτης και την αμέριστη βοήθεια όπου χρειάστηκε.

Με τα μέλη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας ανέπτυξα κατά το χρονικό διάστημα εκπόνησης της διατριβής μου διαπροσωπικές σχέσεις που συνέβαλαν στην επιτυχή κατάληξη του παρόντος πονήματος. Ευχαριστώ τον καθένα στο βαθμό που του αναλογεί, για την ανιδιοτελή συνδρομή του και τη συμβολή στη διαμόρφωση κλίματος ευχάριστης και αποτελεσματικής συνεργασίας. Ιδιαίτερη αναφορά θέλω να κάνω στην ανεκτίμητη συμβολή της αγαπημένης φίλης, υποψηφίας διδάκτορος κ. Κυριακής Λιαδάκη, με την οποία μοιραστήκαμε ώρες παραγωγικής εργασίας και η οποία συμπαραστάθηκε με ειλικρινές ενδιαφέρον σε όλα τα στάδια εκπόνησης της διατριβής μου. Την ευχαριστώ από καρδιάς.



## ***ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

---

## 1. Κληρονομικότητα και ΧΑΠ

Η ΧΑΠ ορίζεται ως η διαταραχή της υγείας που χαρακτηρίζεται από ελάττωση της μέγιστης εκπνεόμενης ροής αέρα, η οποία δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη, συνήθως επιδεινώνεται προοδευτικά και σχετίζεται με εκσεσημασμένη φλεγμονώδη απάντηση σε ερεθιστικά μόρια και αέρια. Είναι δυνατό να προληφθεί και να αντιμετωπιστεί θεραπευτικά, ενώ έχει συστηματικές επιπτώσεις που μεταβάλλουν τη βαρύτητά της. Το κάπνισμα αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου [1], δεδομένου ότι το 90% των ασθενών σε αναπτυγμένες χώρες είναι νυν ή πρώην καπνιστές, γεγονός που υποδηλώνει και τη σημασία των περιβαλλοντικών παραγόντων σε αυτή. Ωστόσο δεν οδηγεί νομοτελειακά στην εκδήλωσή της. Υπολογίζεται ότι λιγότεροι από το 20% των συστηματικών καπνιστών αναπτύσσουν τελικά ΧΑΠ [2, 3], ενώ ορισμένοι εκδηλώνουν τη νόσο πρωιμότερα από άλλους, οπότε εικάζεται ότι και γενετικοί παράγοντες συντελούν σε αυτή. Αναφορικά με την παθογένεσή της, σήμερα κυρίαρχη είναι η εκτίμηση ότι το κάπνισμα και άλλοι περιβαλλοντικοί βλαπτικοί παράγοντες οδηγούν σε ενεργοποίηση της φλεγμονής στους κατώτερους αεραγωγούς, η οποία ενισχύει τη βλαπτική επίδραση αυτών των παραγόντων. Αποτέλεσμα είναι η ανάπτυξη του οξειδωτικού stress, η πρόκληση βλαβών στις δομές του πνεύμονα και η κινητοποίηση μηχανισμών ιστικής ανακατασκευής. Η χρόνια φλεγμονή που χαρακτηρίζει τη νόσο αφορά τους αεραγωγούς, το παρέγχυμα και το αγγειακό δίκτυο των πνευμόνων. Τυχόν λοιμώξεις δρουν περαιτέρω επιβαρυντικά. Ορισμένοι καπνιστές φαίνεται ότι είναι περισσότερο ευαίσθητοι στη επίδραση των περιβαλλοντικών επιβαρυντών και των διαδικασιών της φλεγμονής, ενώ εμφανίζουν και διαφορετική ικανότητα αποκατάστασης των ιστικών βλαβών και είναι ακριβώς αυτοί που θα αναπτύξουν τη νόσο. Οι συγκεκριμένες διαφορές αναζητούνται στη βάση της γενετικής ποικιλομορφίας και της διαφορετικότητας κατά την ανάπτυξη του οργανισμού. Με βάση την επίπτωση της νόσου παγκοσμίως υπολογίζεται ότι αυτή θα αποτελεί την τρίτη αιτία θανάτου ως το 2020 [4]. Επομένως, εντείνεται το ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό του συνόλου των παραγόντων, ενδογενών και περιβαλλοντικών, που αλληλεπιδρώντας καθιστούν ανεπαρκείς τους προστατευτικούς μηχανισμούς του καπνιστή και οδηγούν στην εκδήλωση της ΧΑΠ.

Το κάπνισμα αποτελεί τον κυρίαρχο περιβαλλοντικό παράγοντα που ενοχοποιείται για την ανάπτυξη της ΧΑΠ. Η επίδρασή του στην αναπνευστική ικανότητα εξαρτάται τόσο από την ένταση, όσο και από τη χρονική περίοδο έναρξης της έκθεσης του ατόμου σε αυτό. Έχει διαπιστωθεί ότι το ενεργό κάπνισμα κατά την εφηβεία συνεπάγεται ελάττωση του FEV<sub>1</sub> των ατόμων και της μέγιστης αναπνευστικής ικανότητας που επιτυγχάνουν κατά την ανάπτυξη. Παρόμοια αποτελέσματα φαίνεται ότι προκαλεί και το κάπνισμα της μητέρας κυρίως κατά την περίοδο της κύησης [5] το οποίο, επιπλέον, υποστηρίζεται ότι επηρεάζει και τη μετέπειτα ανάπτυξη του ανοσιακού συστήματος [6]. Επιπλέον, το κάπνισμα κατά την ενήλικη ζωή επιταχύνει την έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας που φυσιολογικά παρατηρείται με τη γήρανση [7]. Φαίνεται, επίσης, ότι και η παθητική έκθεση σε αυτό μπορεί να οδηγήσει σε από-

φραξη των αεραγωγών [8]. Υπάρχουν βέβαια και άλλοι εισπνεόμενοι παράγοντες που δρουν βλαπτικά επί των πνευμόνων, είτε ανεξάρτητα είτε συνεργικά με το κάπνισμα, όπως σκόνες και χημικά που χρησιμοποιούνται για επαγγελματικούς σκοπούς και ατμοσφαιρικοί ρύποι. Επιπλέον, η εκτεταμένη χρήση βιομάζας σε αναπτυσσόμενες χώρες συνεπάγεται σημαντική επιβάρυνση των πνευμόνων που συσχετίζεται με την ανάπτυξη απόφραξης.

Μεταξύ των περιβαλλοντικών παραγόντων που έχουν αιτιακή σχέση με την ανάπτυξη της ΧΑΠ ιδιαίτερη σημασία αποδίδεται στις λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος κατά την παιδική ηλικία, βακτηριακές και ιικές. Έχει διαπιστωθεί ότι παιδιά που προσβάλλονται από λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής τους χαρακτηρίζονται από χαμηλότερα επίπεδα αναπνευστικής λειτουργίας κατά την παιδική ηλικία και κατά την ενήλικη ζωή [9, 10]. Επιπλέον, καπνιστές με ιστορικό αναπνευστικών προβλημάτων πριν από την εφηβεία έχειδειχθεί ότι εμφανίζουν ταχύτερη έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας [11]. Βέβαια, σύμφωνα με άλλες απόψεις οι ιικές λοιμώξεις καθ' αυτές δεν αποτελούν καθοριστές της αναπνευστικής ικανότητας που επιτυγχάνει το άτομο. Αντίθετα, προτείνεται ότι αποτελούν το επακόλουθο άλλων θεωρούμενων ως προδιαθεσικών της αποφρακτικής νόσου παραγόντων, όπως το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, το χαμηλό βάρος γέννησης και η υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών. Πράγματι, η πλειοψηφία των ασθενών με ΧΑΠ είναι χαμηλού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου, γεγονός που επηρεάζει ποικιλοτρόπως την ανάπτυξη του αναπνευστικού συστήματος και το περιβάλλον έκθεσης του ατόμου. Όσον αφορά το χαμηλό βάρος γέννησης, και κατ' επέκταση την ενδομήτρια ανάπτυξη των πνευμόνων ειδικά και του οργανισμού συνολικά, υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις. Φαίνεται, ωστόσο, ότι σχετίζεται με ελαττωμένη αναπνευστική λειτουργία τόσο κατά την παιδική ηλικία όσο και αργότερα κατά την ενήλικη ζωή και πρέπει να θεωρείται ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου της νόσου [9]. Τέλος, υποστηρίζεται ότι και η ανεπαρκής σίτιση σχετίζεται με την ανάπτυξη της νόσου και αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα, ενώ και η απουσία αντιοξειδωτικών στοιχείων από τη δίαιτα των καπνιστών ενδέχεται να συμβάλλει στη διαμόρφωση του προτύπου του "ευαίσθητου" καπνιστή.

Αναφορικά με τους ενδογενείς παράγοντες ιδιαίτερη ερευνητική προσπάθεια καταβάλλεται σχετικά με τη διερεύνηση της υπεραντιδραστικότητας των αεραγωγών, που εκτιμάται ότι χαρακτηρίζει την πλειοψηφία των ασθενών με ΧΑΠ. Σύμφωνα με την υπόθεση των Ολλανδών, προδιαθέτει στην ανάπτυξη αποφρακτικής νόσου. Πράγματι, αποτελέσματα μελετών υποστηρίζουν ότι η αυξημένη αντιδραστικότητα των αεραγωγών είναι ανεξάρτητος παράγοντας πρόκλησης έκπτωσης του FEV<sub>1</sub> και ότι καθιστά το άτομο περισσότερο ευάλωτο στην καταστροφική δράση του καπνίσματος, οδηγώντας σε πρόωμη εκδήλωση ΧΑΠ. Επίσης, η χαμηλότερη υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών έχει συσχετιστεί και με μικρότερο ρυθμό ελάττωσης του FEV<sub>1</sub> κατά τη μακροχρόνια παρακολούθηση ασθενών με διαπιστωμένη έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας [12]. Βέβαια, ενισχύεται η εκτίμηση ότι η υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών που παρατηρείται στη ΧΑΠ διαφέρει από αυτή που χαρακτηρίζει το

άσθμα, δεδομένου ότι η μακροχρόνια χρήση κορτικοειδών, στην πλειοψηφία των ασθενών με ΧΑΠ, δεν επηρεάζει την έκπτωση του FEV<sub>1</sub> [13]. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί πως η αντιδραστικότητα των αεραγωγών κατά τη γέννηση συσχετίζεται με τα επίπεδα του FEV<sub>1</sub> στην ηλικία των 6 ετών, αλλά όχι και με την αντιδραστικότητα των αεραγωγών σε αυτή την ηλικία, και ενδεχόμενα καθορίζει και τα επίπεδα μέγιστης αναπνευστικής ικανότητας που επιτυγχάνει το άτομο [14]. Επομένως, υποστηρίζεται ότι η υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών αποτελεί ένα ενδογενές χαρακτηριστικό, υπαρκτό ήδη από τη γέννηση, που καθορίζει σε σημαντικό βαθμό το επίπεδο αναπνευστικής λειτουργίας που επιτυγχάνει το άτομο και την ευαισθησία του στην ανάπτυξη της ΧΑΠ.

### *1.1. Οικογενής κατανομή*

Το γενετικό υπόβαθρο των ατόμων φαίνεται ότι αποτελεί τον παράγοντα που θα καθορίσει ποιοι καπνιστές ή και μη καπνιστές θα αναπτύξουν ΧΑΠ. Η συγκεκριμένη εκτίμηση υποστηρίζεται από πληθώρα παρατηρήσεων. Ήδη, από τη δεκαετία του 1970, έχει διαπιστωθεί ότι η νόσος αναπτύσσεται συχνότερα ανάμεσα σε συγγενείς ασθενών σε σχέση με συγγενείς μαρτύρων [15, 16, 17, 18, 19, 20]. Ωστόσο, δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί ένας ορισμένος τύπος κληρονομικότητας, ενώ ο σχετικός κίνδυνος που υπολογίζεται διαφέρει μεταξύ των αντίστοιχων μελετών. Έτσι, οι Higgins και συν υπολόγισαν 3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης χρόνιας βρογχίτιδας σε παιδιά ασθενών συγκριτικά με παιδιά μη πασχόντων από χρόνια βρογχίτιδα [15]. Οι Kueppers και συν διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα του FEV<sub>1</sub> ήταν χαμηλότερα στα αδέλφια ασθενών με ΧΑΠ σε σχέση με αδέλφια υγείων μαρτύρων [18]. Οι Larson και συν βρήκαν ότι 23% των συγγενών πρώτου βαθμού ασθενών με ΧΑΠ είχαν απόφραξη των αεραγωγών, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό μεταξύ μαρτύρων ήταν 9% [19]. Μάλιστα, προέκυψε ότι ο αυξημένος κίνδυνος της νόσου ανάμεσα σε συγγενείς ασθενών είναι ανεξάρτητος από άλλους θεωρούμενους προδιαθεσικούς παράγοντες, όπως το κάπνισμα, το ιστορικό λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, το φύλο, η παρουσία ισομορφών της α1-αντιθρυψίνης και άλλοι [16, 17]. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός συγγένειας με τους πάσχοντες από ΧΑΠ τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου στους συγγενείς αυτών [16]. Αργότερα, διαπιστώθηκε σημαντική ομοιότητα της αναπνευστικής λειτουργίας μεταξύ συγγενών, η οποία επίσης ελαττώνεται με την ελάττωση του βαθμού συγγένειας [21].

Υπέρ της γενετικής επιβάρυνσης στην ανάπτυξη της ΧΑΠ είναι και τα αποτελέσματα από μελέτες της αναπνευστικής λειτουργίας σε διδύμους. Οι τελευταίες κατέλειξαν σε παρόμοια σπироμετρικά ευρήματα μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων, ενώ ανάμεσα σε διζυγωτικούς διδύμους παρατηρήθηκαν σημαντικά μικρότερες ομοιότητες [22]. Επιπλέον, διερευνήθηκε η επίδραση του καπνίσματος σε ζευγάρια μονοζυγωτικών διδύμων, που είτε ανατράφηκαν στο ίδιο περιβάλλον είτε χωριστά. Διαπιστώθηκε ότι, και στις δύο περιπτώσεις, χαρακτηρίζονταν ταυτόχρονα είτε από ευαισθησία στην επίδραση του καπνίσματος είτε από αντοχή έναντι της βλαπτικής δράσης του για παρόμοια καπνιστική συνήθεια. Αντίστοιχα, εμφάνιζαν ταυτόχρονα

περιορισμό της αναπνευστικής ικανότητας ή διατηρούσαν φυσιολογική λειτουργία των πνευμόνων [23, 24].

Τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και από μεταγενέστερες μελέτες. Έτσι, από την εξέταση 5003 μελών 1408 οικογενειών της περιοχής της Μασαχουσέτης προέκυψε σημαντική συσχέτιση της αναπνευστικής λειτουργίας ανάμεσα σε γονείς και παιδιά, με μεγαλύτερη αυτή μεταξύ μητέρας-παιδιού [25]. Ακόμα μεγαλύτερη συσχέτιση αναδείχτηκε ανάμεσα σε αδέρφια, ενώ ανάλογη παρατήρηση δεν υπήρξε μεταξύ συζύγων. Αντίστοιχα, εξετάστηκε η αναπνευστική λειτουργία σε 173 αδέρφια 150 ασθενών με σοβαρή ΧΑΠ και έγινε σύγκριση με 439 μάρτυρες ανάλογου φύλου, ηλικίας και ιστορικού καπνίσματος, αλλά όχι και ανάλογου οικογενειακού ιστορικού [26]. Υπολογίστηκε, ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης της νόσου ανάμεσα στα αδέρφια των ασθενών με ιστορικό καπνίσματος <30 yrs ήταν 5,3 φορές μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο κίνδυνο μεταξύ των μαρτύρων. Για ιστορικό καπνίσματος >30yrs ο αντίστοιχος κίνδυνος ήταν 3,67. Παρόμοιο αποτέλεσμα προέκυψε και κατά την εξέταση 44 ασθενών με σοβαρή, πρώιμα εκδηλωμένη ΧΑΠ και 204 συγγενών πρώτου βαθμού αυτών [27]. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 20 υγιείς ενήλικες αντίστοιχου φύλου, ηλικίας και ιστορικού καπνίσματος και 54 συγγενείς πρώτου βαθμού αυτών. Διαπιστώθηκε ότι οι συγγενείς των ασθενών, καπνιστές και πρώην καπνιστές, είχαν σημαντικά χαμηλότερες μέσες τιμές FEV<sub>1</sub> και FEV<sub>1</sub>/FVC σε σχέση με τους συγγενείς των μαρτύρων. Επίσης, ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης απόφραξης στους συγγενείς, καπνιστές και πρώην καπνιστές, υπολογίστηκε, για FEV<sub>1</sub><80%, ότι είναι 2,7 και για FEV<sub>1</sub><60%, 3,1. Το σύνολο των αποτελεσμάτων, επομένως, ενισχύει την εκτίμηση ότι η αναπνευστική λειτουργία του ατόμου, καθώς και ο κίνδυνος ανάπτυξης ΧΑΠ, καθορίζεται από την αλληλεπίδραση του γενετικού υλικού με περιβαλλοντικούς παράγοντες.

## *1.2. Πανγενωμικές μελέτες*

Η γενετικά καθορισμένη προδιάθεση ανάπτυξης της ΧΑΠ καταδεικνύεται και μέσα από πανγενωμικές αναλύσεις, σε υγιείς μάρτυρες και σε ασθενείς με τη νόσο, που έχουν αναδείξει γενετικούς καθοριστές της αναπνευστικής λειτουργίας. Έτσι, από πανγενωμική μελέτη 1578 υγιών ενηλίκων, μελών 330 οικογενειών προέκυψε ότι οι γενετικοί τόποι που κυρίως επηρέαζαν τις παραμέτρους FEV<sub>1</sub> και FVC συνεντοπίζονταν στα χρωμοσώματα 4, 6 και 21. Ωστόσο, τα πρότυπα συσχέτισης με τα σπιρομετρικά ευρήματα ποίκιλαν [28]. Μεταγενέστερη πανγενωμική ανάλυση συμπεριέλαβε 2178 μέλη 391 διαφορετικών γενεαλογικών δέντρων, που αποτέλεσαν αρχικά το υλικό αναζήτησης γενετικών συσχετίσεων καρδιαγγειακών νοσημάτων. Από αυτή αναδείχθηκε σημαντική σύνδεση του λόγου FEV<sub>1</sub>/FVC με ένα τόπο περίπου 28cM του χρωμοσώματος 4 (LOD 3.51). Μάλιστα σε αυτή την περιοχή εδράζεται το γονίδιο της υπεροξειδικής δισμουτάσης 3, η οποία έχει καθοριστική αντιοξειδωτική λειτουργία στον πνεύμονα και προτάθηκε η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης πολυμορφισμών του γονιδίου της με το λόγο FEV<sub>1</sub>/FVC. Επιπλέον, δύο τόποι στο χρωμόσωμα 18 συσχετίστηκαν ηπιότερα με τις παραμέτρους FEV<sub>1</sub> [LOD 2,37 (στα 31 cM)] και FVC [LOD 2,88 (στα 79 cM)]. Εικάζεται ότι

γονίδια που εδράζονται σε αυτές τις περιοχές είναι σημαντικά για τη φυσιολογική ανάπτυξη των πνευμόνων [29].

Ανάλογη μελέτη συμπεριέλαβε 582 μέλη 72 διαφορετικών γενεαλογικών δέντρων, στα οποία εμφανίζονταν άτομα με πρώιμη εκδήλωση σοβαρής ΧΑΠ, ενώ είχε αποκλειστεί προηγουμένως η πιθανότητα ανεπάρκειας της  $\alpha_1$ ΑΤ. Διαπιστώθηκε σημαντική σύνδεση του λόγου  $FEV_1/FVC$  με μια περιοχή του χρωμοσώματος 2q (LOD 4,12), ο σχετικός κίνδυνος υπολογίστηκε σε 35,3% και σημαντικές μεταβλητές βρέθηκε ότι αποτελούσαν η ηλικία, το φύλο και το κάπνισμα. Επιπλέον, προέκυψαν ενδείξεις σύνδεσης του λόγου  $FEV_1/FVC$  με τα χρωμοσώματα 17 (LOD 2,03) και 1 (LOD 1,92) και του FVC με το χρωμόσωμα 1 (LOD 2,05). Με την πρόσθετη εκτίμηση 12 STR δεικτών στο χρωμόσωμα 12p προέκυψαν ενδείξεις σύνδεσης του  $FEV_1$  με τη συγκεκριμένη περιοχή (LOD 2,43) [30]. Επιπλέον, κατά την ανάλυση του ίδιου πληθυσμού, συσχετίστηκαν φαινότυποι της νόσου, συγκεκριμένα η ήπια και η μέτρια ΧΑΠ, με περιοχές των χρωμοσωμάτων 12p και 19 [31]. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι ορισμένα από τα γονίδια, των οποίων η σημασία στην ανάπτυξη της νόσου εξετάζεται και πιθανολογείται από αρκετά στοιχεία, όπως αναφέρεται στη συνέχεια, εδράζονται ακριβώς στις περιοχές που συνδέθηκαν με τη νόσο στις προαναφερόμενες μελέτες, όπως το *IL8RA* στην περιοχή 2q και το *MGST1* κοντά στην περιοχή 12p.

Μεταγενέστερη πανγενωμική ανάλυση του μεγαλύτερου τμήματος του πληθυσμού που εξετάστηκε στις δύο προαναφερόμενες μελέτες ανέδειξε σημαντική συσχέτιση του μεταβρογχοδιαστολή  $FEV_1$  με γενετικούς σημειωτές των χρωμοσωμάτων 8p (LOD 3,30) και 1q (LOD 2,24). Επίσης, κατέλειξε στη διαπίστωση ισχυρής συσχέτισης του μεταβρογχοδιαστολή  $FEV_1/FVC$  με σημειωτές των χρωμοσωμάτων 2q (LOD 4,42) και 1q (LOD 2,52). Οι συνδέσεις που προέκυψαν με τις μετά βρογχοδιαστολή σπιρομετρικές παραμέτρους ήταν σημαντικότερες, αν και αφορούσαν τους ίδιους τόπους, με τις αντίστοιχες προ βρογχοδιαστολής. Κατά συνέπεια, οι μελετητές πρότειναν ότι τα μετά βρογχοδιαστολή σπιρομετρικά ευρήματα αποτελούν ιδανικούς φαινότυπους για γενετικές μελέτες της ΧΑΠ [32]. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκαν συνδέσεις των FEF25-75% και FEF25-75%/FVC με περιοχές των χρωμοσωμάτων 2q και 12p. Εξάλλου, με τον περιορισμό της ανάλυσης μόνο σε καπνιστές προέκυψαν συνδέσεις με τα χρωμοσώματα 16, 20 και 22. Επομένως διατυπώθηκε η εκτίμηση ότι στις συγκεκριμένες περιοχές λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις γονιδίων-καπνίσματος που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της ΧΑΠ [33]. Τα κυριότερα αποτελέσματα (LOD>1,5) όλων των προαναφερόμενων πανγενωμικών αναλύσεων φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 1. Είναι απαραίτητο να τονιστεί ότι οι παραπάνω αναλύσεις κατέλειξαν σε διαφορετικές συνδέσεις κατά τη μελέτη διαφορετικών πληθυσμών. Η επανάληψη των αποτελεσμάτων κρίνεται απαραίτητη για την εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων και τη στοχευμένη διερεύνηση γονιδίων στους αντίστοιχους τόπους.

**Πίνακας 1:** Γενετικοί καθοριστές της αναπνευστικής λειτουργίας από πανγενωμικές αναλύσεις

Μελέτη	Συσχετιζόμενη παράμετρος	Χρωμόσωμα	LOD (cM) <sup>\$</sup>
DeMeo et al, 2004 [33]	FEF25-75%/FVC μετά βρογχοδιαστολή (στο σύνολο)	2	2,60 (216)
	FEF25-75%/FVC μετά βρογχοδιαστολή (σε καπνιστές)	2	4,12 (221)
	FEF25-75%/FVC μετά βρογχοδιαστολή (σε καπνιστές)	12	3,46 (35)
	FEF25-75%/FVC μετά βρογχοδιαστολή (σε καπνιστές)	16	2,04 (86)
	FEF25-75% μετά βρογχοδιαστολή (σε καπνιστές)	12	5,03 (35)
	FEF25-75% μετά βρογχοδιαστολή (σε καπνιστές)	22	2,46 (16)
	FEV <sub>1</sub> /FVC (σε καπνιστές)	2	4,13 (229)
	FEV <sub>1</sub> (σε καπνιστές)	12	3,26 (36)
Palmer et al, 2003 [32]	FEV <sub>1</sub> μετά βρογχοδιαστολή	8p	3,30 (2)
	FEV <sub>1</sub> μετά βρογχοδιαστολή	1q	2,24 (136)
	FEV <sub>1</sub> μετά βρογχοδιαστολή	8q	2,01 (163)
	FEV <sub>1</sub> /FVC μετά βρογχοδιαστολή	2q	4,42 (222)
	FEV <sub>1</sub> /FVC μετά βρογχοδιαστολή	1q	2,52 (118)
	FEV <sub>1</sub> /FVC μετά βρογχοδιαστολή	17	2,44 (67)
Wilk et al, 2003 [29]	FEV <sub>1</sub> /FVC	4	3,51 (28)
	FEV <sub>1</sub>	18	2,37 (31)
	FVC	18	1,54 (31)
	FVC	18	2,88 (79)

Μελέτη	Συσχετιζόμενη παράμετρος	Χρωμόσωμα	LOD (cM) <sup>§</sup>
Silverman et al, 2002 [31]	Ήπια απόφραξη αεραγωγών* (σε καπνιστές)	19	1,64
	Ήπια απόφραξη αεραγωγών (στο σύνολο) (παραγοντική)	12p	2,61
	Ήπια απόφραξη αεραγωγών (σε καπνιστές) (παραγοντική)	12p	3,14
	Μέτρια απόφραξη αεραγωγών‡ (στο σύνολο)	12p	1,7
	Μέτρια απόφραξη αεραγωγών (στο σύνολο)	19	1,54
	Μέτρια απόφραξη αεραγωγών(στο σύνολο)	12p	2,13
	Μέτρια απόφραξη αεραγωγών(στο σύνολο) (παραγοντική)	12p	2,09
	Χρόνια βρογχίτιδα (σε καπνιστές)	22q	2,08
Silverman et al, 2002 [30]	FEV <sub>1</sub> /FVC	2q	4,12 (222)
	FEV <sub>1</sub> /FVC	17	2,03 (67)
	FEV <sub>1</sub> /FVC	1	1,92 (120)
	FVC	1	2,05 (13)
Joost et al, 2002 [28]	FEV <sub>1</sub>	12p	2,43 (37)
	FEV <sub>1</sub>	6q	2,4
	FVC	21p	2,6

\*Ήπια απόφραξη αεραγωγών: FEV<sub>1</sub><80% και FEV<sub>1</sub>/ FVC<90%  
 ‡ Μέτρια απόφραξη αεραγωγών: FEV<sub>1</sub><60% και FEV<sub>1</sub>/ FVC<90%  
 §LOD>3 υποδηλώνει αποτέλεσμα σημαντικό για σύνδεση, LOD<3 υποδηλώνει αποτέλεσμα ενδεικτικό για σύνδεση



### 1.3. Μελέτες συσχέτισης

#### 1.3.1. $\alpha_1$ -Αντιθρυψίνη

Η διερεύνηση της γενετικής επιβάρυνσης που υπόκειται της ΧΑΠ εν πολλοίς έγκειται στην αναζήτηση αλληλομόρφων γονιδίων, τα οποία εικάζεται ότι συναντούνται συχνότερα στη νόσο. Τα γονίδια, που ελέγχονται, επιλέγονται κατά κανόνα στη βάση της σημασίας των προϊόντων που κωδικοποιούν στην παθοφυσιολογία της νόσου. Τα αποτελέσματα συχνά είναι αντικρουόμενα. Η μόνη καλά τεκμηριωμένη σχέση αφορά συγκεκριμένους πολυμορφισμούς της  $\alpha_1$ AT (SERPINE1), μιας ισχυρής αντιπρωτεάσης που αναστέλλει τη δράση της ελαστάσης των ουδετερόφιλων [34]. Παράγεται κυρίως στο ήπαρ, αλλά και από τα κυψελιδικά μακροφάγα και τα περιφερικά μονοκύτταρα και έχουν αναγνωριστεί πάνω από 70 βιοχημικές παραλλαγές της (σύστημα-Pi) [35]. Το ενδιαφέρον στρέφεται κυρίως στα τρία συχνότερα ανιχνευόμενα αλληλόμορφα του γονιδίου της, το M, που αποτελεί το αλλήλιο άγριου τύπου, και τα S και Z. Άτομα με γονότυπο MM εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα της κυκλοφορούσας πρωτεΐνης και θεωρούνται φυσιολογικά.

Το Z αλληλόμορφο του γονιδίου της  $\alpha_1$ AT προκύπτει από σημειακή μετάλλαξη, η οποία ευθύνεται για την αντικατάσταση γλουταμινικού οξέος από λυσίνη στη θέση 342 της αμινοξικής ακολουθίας. Ανευρίσκεται με συχνότητα 4% σε Καυκάσιους, Βορειοευρωπαίους [36]. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός ευθύνεται για αλλαγή στην τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης, που συνεπάγεται τον πολυμερισμό της εντός του ενδοπλασματικού δικτύου των ηπατοκυττάρων και την ελάττωσή της στην περιφέρεια [37]. Σε ετεροζυγώτες MZ ανιχνεύονται επίπεδα κυκλοφορούσας  $\alpha_1$ AT της τάξης του 80% των φυσιολογικών.

Σε ομοζυγώτες ZZ παρατηρείται σημαντική ανεπάρκεια της  $\alpha_1$ AT, καθώς ελαττώνεται σε επίπεδα χαμηλότερα του 15% της φυσιολογικής συγκέντρωσης. Οι τελευταίοι βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης νεογνικής ηπατίτιδας, πρώιμης ανάπτυξης κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Η συγκεκριμένη ομοζυγωτική κατάσταση έχει συσχετιστεί με επιτάχυνση της έκπτωσης της αναπνευστικής λειτουργίας, ανεξάρτητη του καπνίσματος, και με ανάπτυξη ΧΑΠ σε μη καπνιστές [38]. Το κάπνισμα φαίνεται ότι επιτείνει τις συνέπειες της ανεπάρκειας και οδηγεί στην εκδήλωση ΧΑΠ πριν από την ηλικία των 40 ετών [39]. Επίσης, έχει ενοχοποιηθεί για βράχυνση του προσδόκιμου επιβίωσης, που εκτιμήθηκε σε 16% σε ομοζυγώτες καπνιστές στην ηλικία των 60 ετών συγκριτικά με το 85% που υπολογίστηκε σε μη φέροντες τον πολυμορφισμό [39]. Βέβαια, ακόμα και ανάμεσα στους ZZ ομοζυγώτες παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση ως προς την εκδήλωση αναπνευστικής νόσου, με ορισμένους να παραμένουν ασυμπτωματικοί σε προχωρημένη ηλικία. Ωστόσο, η ομοζυγωτία αναγνωρίζεται με συχνότητα περίπου 0,06% στο γενικό πληθυσμό [40, 41] και συνεπώς δεν είναι δυνατό να αποτελεί την καθοριστική γενετική επιβάρυνση που αναζητείται στη διαδικασία ανάπτυξης της ΧΑΠ.

Αντικρουόμενες απόψεις υπάρχουν σχετικά με τον κίνδυνο ανάπτυξης ΧΑΠ σε ΜΖ ετεροζυγώτες. Ευρήματα υπέρ της γενετικά καθορισμένης προδιάθεσής τους στην εκδήλωση της νόσου υπήρχαν ήδη από τη δεκαετία του 1970 [42, 43] και μεταγενέστερα επαναλήφθηκαν. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι το Ζ αλληλίο εμφανίζεται συχνότερα μεταξύ καπνιστών-ασθενών σε σχέση με καπνιστές-μάρτυρες, κάτι που δεν φάνηκε να ισχύει για το S αλληλίο [44]. Επιπλέον, σε προοπτική μελέτη 10 ετών ο συγκεκριμένος γονότυπος συσχετίστηκε με ελαττωμένη αντιπρωτεασική δραστηριότητα της θρυψίνης και συν τω χρόνω με χαμηλότερο FEV<sub>1</sub>, χαμηλότερες εκπνευστικές ροές, ελαττωμένη ικανότητα διάχυσης για το μονοξείδιο του άνθρακα και αύξηση της ολικής χωρητικότητας και του υπολειπόμενου όγκου των πνευμόνων [45]. Συνολικά φαίνεται ότι σχετίζεται με ταχύτερη έκπτωση του FEV<sub>1</sub>, ιδιαίτερα όταν συνυπάρχει οικογενειακό ιστορικό ΧΑΠ [46, 47]. Επίσης, συνδέεται με συχνότερες νοσηλείες και αυξημένη θνητότητα εξαιτίας της νόσου και προτείνεται ότι ευθύνεται για το ίδιο ποσοστό ασθενών με ΧΑΠ (2%) που αποδίδεται και στο σπανιότερο ΖΖ γονότυπο [46]. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα ευρήματα αμφισβητήθηκαν. Έτσι, μακροχρόνια μελέτη (15 ετών) σε κατοίκους της Αριζόνας κατέληξε στο ότι δεν υπάρχει συσχέτιση των γονοτύπων ΜΖ και ΜS με την έκπτωση του FEV<sub>1</sub>, τη χρόνια βρογχίτιδα, το εμφύσημα και την επιβίωση [48]. Εξάλλου, σε Κορεάτες τα αλληλία Ζ και S δεν ανιχνεύτηκαν τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθενείς με ΧΑΠ [49].

Το S αλληλόμορφο προκύπτει από σημειακή μετάλλαξη που ευθύνεται για την αντικατάσταση γλουταμινικού οξέος από βαλίνη στη θέση 264 της αμινοξικής ακολουθίας και ανιχνεύεται σε ποσοστό 28% σε Βόρειοευρωπαίους [36]. Ο γονότυπος ΜS συνεπάγεται ελάττωση της κυκλοφορούσας α<sub>1</sub>ΑΤ περίπου στο 90% των φυσιολογικών επιπέδων, γεγονός που αποδίδεται, επίσης, στον πολυμερισμό της εντός του ενδοπλασματικού δικτύου [50]. Ωστόσο, δεν φαίνεται να σχετίζεται με την ανάπτυξη πνευμονικής νόσου [42, 43, 44].

Σε συνδυασμό με αυτά, στον προαγωγέα του γονιδίου της α<sub>1</sub>ΑΤ ανιχνεύτηκε πολυμορφισμός με τη χρήση του ενζύμου περιορισμού Taq I, που συνίσταται σε αντικατάσταση γουανίνης από αδερίνη (G1237A). Το αντίστοιχο αλληλίο φέρεται ως Ε ή T2 και δεν σχετίζεται με ελάττωση των επιπέδων της α<sub>1</sub>ΑΤ σε σταθερή κατάσταση. Ωστόσο, περιορίζει σημαντικά την αύξησή της κατά την οξεία φάση της φλεγμονής [51]. Αρχικά, συσχετίστηκε με την ανάπτυξη ΧΑΠ και ο σχετικός κίνδυνος στους φέροντες έστω και ένα T2 αλληλίο υπολογίστηκε ότι είναι 3,3 φορές υψηλότερος σε σχέση με τους φέροντες τον wt γονότυπο [52, 53]. Ωστόσο, αργότερα το αποτέλεσμα δεν επαναλήφθηκε [54], οπότε παραμένει το ερώτημα σχετικά με την πιθανή σημασία του στην ανάπτυξη της ΧΑΠ. Αξίζει να σημειωθεί, ότι, αρκετοί ακόμα πολυμορφισμοί του γονιδίου της α<sub>1</sub>ΑΤ και συνδυασμοί αυτών ελέγχονται σε σχέση με τη νόσο. Πρόσφατα, μάλιστα, αναγνωρίστηκαν έξι νέοι απλότυποι που συσχετίστηκαν με έξι ως πενήντα φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ΧΑΠ [55].

### 1.3.2. Άλλες αντιπρωτεάσες

Η αποδεδειγμένη συσχέτιση των αλληλομόρφων του γονιδίου της  $\alpha_1$ AT με την ανάπτυξη της ΧΑΠ οδήγησε στην αναζήτηση ανάλογων σχέσεων της νόσου με αλληλόμορφα γονιδίων άλλων πρωτεϊνών με παρόμοια λειτουργία. Η  $\alpha_1$ -αντιχυμοθρυψίνη (SERPINE3) δρα επίσης ως αναστολέας πρωτεασών της σερίνης και πρωτεΐνη οξείας φάσης. Στο γονίδιο της (ACT) αναγνωρίστηκαν δύο πολυμορφισμοί του ενός νουκλεοτιδίου (SNPs). Ο πολυμορφισμός Leu55Pro προκαλεί περιορισμό της κυκλοφορούσας πρωτεΐνης στο 80%, καθώς και διαταραχή της λειτουργίας της και ανιχνεύτηκε σε τρεις ανάμεσα σε 200 ασθενείς, αλλά όχι και σε μάρτυρες, σε ένα γερμανικό πληθυσμό. Μάλιστα, ένας από τους ετεροζυγώτες φορείς ανήκε σε μια οικογένεια της οποίας τρία μέλη εμφάνιζαν πρόωμη έναρξη ΧΑΠ και απομονώθηκε από τα μέλη αυτής που εμφάνιζαν τη νόσο σε τρεις συνεχόμενες γενιές. Ο πολυμορφισμός Pro229Ala συνεπάγεται ελάττωση περίπου στο 60% των φυσιολογικών επιπέδων και ανιχνεύτηκε, όπως και ο προηγούμενος, μεταξύ ασθενών αλλά όχι μεταξύ μαρτύρων σε ένα γερμανικό πληθυσμό [56, 57]. Με βάση τα παραπάνω και οι πολυμορφισμοί του ACT θεωρήθηκε ότι προδιαθέτουν γενετικά στην ανάπτυξη αποφρακτικής νόσου, αλλά η μεμονωμένη επίδρασή τους δεν είναι δυνατό να δώσει ερμηνεία στην πληθώρα των κρουσμάτων. Ωστόσο, τα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τα αντίστοιχα μελετών σε Καναδούς, Ρώσους και Ιάπωνες [58, 59, 60], αν και σε Ιάπωνες η νόσος συσχετίστηκε με ομοζυγωτία ως προς τον πολυμορφισμό Ala-15Pro του προαγωγέα του γονιδίου.

Άλλος ένας αναστολέας πρωτεασών με προστατευτική δράση στον πνεύμονα είναι η  $\alpha_2$ -μακροσφαιρίνη, αυξημένα επίπεδα ορού της οποίας έχουν προσδιοριστεί σε άτομα με ανεπάρκεια της  $\alpha_1$ AT. Αναφορικά με τους πολυμορφισμούς του γονιδίου της, διαπιστώθηκε ότι, ο πιο συχνός SNP Val1000Ile εμφανίζεται εξίσου συχνά σε ασθενείς με ΧΑΠ και σε υγιείς, ενώ η μετάλλαξη Cys972Tyr που εντοπίστηκε σε ασθενή δεν προκαλεί ελάττωση των επιπέδων της πρωτεΐνης στον ορό [61]. Αντίθετα, με τη βοήθεια του ενζύμου περιορισμού PvuII ανιχνεύτηκε μετάλλαξη, σε ετεροζυγωτία, σε ασθενή που εμφάνιζε κατά 50% ελαττωμένα επίπεδα  $\alpha_2$ -μακροσφαιρίνης ορού. Ο τελευταίος χαρακτηριζόταν από πρόωμη έναρξη πνευμονικής νόσου ήδη από την παιδική ηλικία που εξελίχτηκε σε πολύ σοβαρή ΧΑΠ. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν εντοπίστηκε σε άλλους ασθενείς και σε μάρτυρες, με αποτέλεσμα η κλινική εικόνα του φορέα αυτής να συσχετιστεί με την παρουσία της νόσου [62].

Στους αναστολείς πρωτεασών περιλαμβάνεται και η πρωτεΐνη SERPINE2, που δρα κυρίως ως αναστολέας θρομβίνης, ουροκινάσης και πλασμίνης, και το γονίδιο της οποίας εδράζεται στην περιοχή 2q που έχει σχετιστεί με τη ΧΑΠ. Κατά συνέπεια, εξετάστηκε η πιθανότητα πολυμορφισμοί του γονιδίου της να επηρεάζουν την εκδήλωση της νόσου. Πράγματι, αρκετοί SNPs του SERPINE2 (rs16865421, rs6734100, rs729631, rs975278 και άλλοι) συσχετίστηκαν με τη βαρύτητα της νόσου και με τα σπироμετρικά ευρήματα ( $FEV_1$ ,  $FEV_1/FVC$ ) τόσο σε μελέτες οικογενειών, όσο και σε μεγάλες μελέτες ασθενών-μαρτύρων των 744 και 1929 ατόμων [63, 64]. Έτσι, μολονότι δεν έχει αναγνωριστεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου συμβάλ-

λει, πιθανολογείται ότι ανήκει στα γονίδια που επηρεάζουν την ευαισθησία στην ανάπτυξη της ΧΑΠ. Πρέπει να αναφερθεί, ωστόσο, ότι εξίσου μεγάλη μελέτη ασθενών-μαρτύρων σε αντίστοιχο πληθυσμό 1018 ασθενών και 911 μαρτύρων αμφισβήτησε προηγούμενα ευρήματα αναφορικά με τους πολυμορφισμούς rs1438831, rs920251, rs6747096, rs3795879 και rs49785625, οπότε περαιτέρω διερεύνηση απαιτείται [65].

### 1.3.3. Μεταλλοπρωτεΐνάσες και ιστικοί αναστολείς τους

Οι MMPs συνιστούν μια οικογένεια 20 περίπου πρωτεολυτικών ενζύμων εξειδικευμένων ως προς τα υποστρώματα εκδήλωσης της δράσης τους, με αναγνωρισμένη σημασία για τη φυσιολογική ανάπτυξη και την ιστική αποκατάσταση σε συνθήκες υγείας. Η υπερέκφραση τους έχει σχετιστεί με την εξέλιξη ποικιλίας καταστρεπτικών διεργασιών, όπως η εισβολή καρκινικών κυττάρων και η επακόλουθη αγγειογένεση, η αρθρίτιδα και η αθηρωσκήλωση. Ανάμεσα σε αυτές οι MMP1 (κολλαγενάση), MMP9 (τζελατινάση Β) και MMP12 (ελαστάση των μακροφάγων) έχειδειχθεί ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη του εμφυσήματος. Η μελέτη των γονιδίων τους αποκάλυψε την ύπαρξη πολυμορφισμών των προαγωγέων που αυξάνουν την έκφρασή τους. Κατ' επέκταση, διερευνήθηκε η επίδραση των τελευταίων στην επαγόμενη από το κάπνισμα ιστική βλάβη στον πνεύμονα.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο πολυμορφισμός G-1607G του προαγωγέα του *MMP1*, που συνίσταται σε εισαγωγή γουανίνης και δημιουργεί μία θέση σύνδεσης του παράγοντα μεταγραφής ETS-1. Κατά τον *in vitro* έλεγχο κυττάρων μετά από επίδραση αποστάγματος καπνού τσιγάρου διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του πολυμορφισμού συνεπαγόταν την αύξηση της δραστηριότητας του προαγωγέα τουλάχιστον κατά τρεις φορές [66]. Έτσι, προτείνεται ότι πιθανά προδιαθέτει τους καπνιστές-φορείς του σε αυξημένο κίνδυνο ΧΑΠ. Η μη αναμενόμενη ανίχνευση του αλληλίου -1607G με αυξημένη συχνότητα μεταξύ των καπνιστών με ταχεία έκπτωση του FEV<sub>1</sub>, αποδόθηκε σε γειτονικό, άγνωστο αλληλίο σε ανισσοροπία σύνδεσης με το πρώτο [67]. Στην ίδια μελέτη εξετάστηκε και ο Asn357Ser πολυμορφισμός του *MMP12*, για τον οποίο δεν είναι γνωστό πως επηρεάζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης, χωρίς να συσχετιστεί με το ρυθμό έκπτωσης του FEV<sub>1</sub> των καπνιστών. Ωστόσο, σε καπνιστές με ταχεία έκπτωση του FEV<sub>1</sub> ανιχνεύτηκε συχνότερα ο απλότυπος MMP1-1607G/MMP12Asn357, ενώ ο απλότυπος MMP1-1607G/MMP12 Ser357 ήταν σπάνιος σε αυτούς [67]. Τα ευρήματα πιθανά υποδηλώνουν αλληλεξάρτηση μεταξύ των αλληλίων. Εναλλακτικά ενδέχεται οι απλότυποι να είναι δείκτες για, και σε ανισσοροπία σύνδεσης με, το υπεύθυνο αλληλίο, που βρίσκεται σε άμεση γειτνίαση στο χρωμόσωμα. Μελετήθηκε, επίσης, ο πολυμορφισμός A-82G του *MMP12*, ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα AP-1, αλλά δεν συσχετίστηκε με την αναπνευστική λειτουργία. Ομοίως, ο πολυμορφισμός C-1562T του *MMP9*, που συνίσταται σε μετάπτωση μιας κυτοσίνης σε θυμίνη στη θέση -1562 και συνεπάγεται ελαττωμένη συγγένεια σύνδεσης με ένα καταστολέα της μεταγραφής, δεν φάνηκε να σχετίζεται με το ρυθμό ελάττωσης του FEV<sub>1</sub> στους καπνιστές [67]. Πρόσφατα,

προτάθηκε ότι το 1562T πολυμορφικό αλληλίο του *MMP9*, αν και δεν επηρεάζει την ευαισθησία στην ανάπτυξη της ΧΑΠ, σχετίζεται με εκδήλωση σοβαρότερης νόσου (σταδίου 4 κατά GOLD) [68]. Αντίθετα, ο πολυμορφισμός Gln279Arg στο εξόνιο 6 του *MMP9*, που επηρεάζει τη θέση σύνδεσης με το υπόστρωμα, συσχετίστηκε με τη ΧΑΠ. Οι ομοζυγώτες ως προς αυτόν διαπιστώθηκε ότι αντιμετωπίζουν τρεις φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου σε σχέση με τους φέροντες το wt γονίδιο [69].

Η σημασία των MMPs και των πολυμορφισμών τους στην ανάπτυξη της ΧΑΠ οδήγησε και στη διερεύνηση του ρόλου των ιστικών αναστολέων τους (TIMPs). Από τις πρωτεΐνες της οικογένειας των TIMPs φαίνεται ότι κυρίως οι TIMP-1 και TIMP-2 έχουν ρόλο στη παθογένεση νοσημάτων του πνεύμονα που χαρακτηρίζονται από μεταβολές της δομής των κυψελίδων και παθολογικές διεργασίες ιστικής ανακατασκευής. Επιπλέον, ο TIMP-2 έχειδειχθεί ότι παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη του εμφυσήματος. Έτσι, με το σκεπτικό ότι μεταλλάξεις που καταστέλλουν τη δραστηριότητα του TIMP-2 ενδεχομένως επιτείνουν την πνευμονική βλάβη, αναγνωρίστηκαν δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου του. Ο ένας προκύπτει από μετάπτωση μιας γουανίνης σε αδενίνη (G/A) στο εξόνιο 3 στη θέση 853 και δεν μεταβάλλει το νουκλεοτίδιο, και ο δεύτερος από μετάπτωση μιας γουανίνης σε κυτοσίνη (G/C) στη θέση -418 του προαγωγέα. Σε μελέτη ιαπωνικού πληθυσμού διαπιστώθηκε συχνότερη παρουσία του αλληλίου άγριου τύπου 853G και του πολυμορφικού αλληλίου -418C στους ασθενείς με ΧΑΠ, οπότε εκτιμήθηκε ότι μπορεί να σχετίζονται οι πολυμορφισμοί με την ανάπτυξη της νόσου [70]. Αργότερα, σε Αιγύπτιους, διαπιστώθηκε διαφορετική επίπτωση του γονότυπου του ετερόζυγου ως προς τον +853G>A πολυμορφισμό μεταξύ ασθενών και μαρτύρων, αλλά όχι σημαντικά διαφορετική συχνότητα ανίχνευσης των αλληλίων. Επίσης, δεν προέκυψε συσχέτιση του -418G>C πολυμορφισμού με τη νόσο [71]. Επιπλέον, σε Ιάπωνες, ο -418G>C δείχτηκε ότι βρίσκεται σε ανισσοροπία σύνδεσης με δύο νέους πολυμορφισμούς, τους -177C>T και 34C>A. Διαπιστώθηκε, ωστόσο, ότι η λειτουργία του προαγωγέα δεν επηρεάζεται από τους τρεις αυτούς πολυμορφισμούς. Προτάθηκε ότι οι τελευταίοι βρίσκονται σε ανισσοροπία σύνδεσης με άλλους, λειτουργικούς πολυμορφισμούς, που ευθύνονται για την παρατηρούμενη συσχέτιση με τη ΧΑΠ [72].

#### *1.3.4. Ένζυμα εμπλεκόμενα στο οξειδωτικό stress*

Στην παθογένεση της ΧΑΠ ιδιαίτερη σημασία αποδίδεται στο οξειδωτικό stress που επάγεται από το κάπνισμα. Έχει διαπιστωθεί ότι το κάπνισμα οδηγεί στην απελευθέρωση ελευθέρων ριζών και οξειδωτικών παραγόντων συντελώντας στην κυτταρική και ιστική βλάβη που ξεκινά και συντηρεί τη βλάβη του πνεύμονα. Η μικροσωματική εποξειδική υδρολάση (mEPHX) είναι ένα βασικό ένζυμο του μεταβολισμού των επιβλαβών εποξειδίων που προέρχονται από το κάπνισμα και από διάφορα χημικά και έχειδειχθεί ότι εκφράζεται στο βρογχικό επιθήλιο. Στο γονίδιο της εντοπίζονται δύο πολυμορφισμοί που μεταβάλλουν τη δραστηριότητά της. Ο πρώτος εντοπίζεται στο εξόνιο 3, συνίσταται σε αντικατάσταση τυροσίνης από ιστι-

δίνη (Y113H, Tyr113His, rs1051740) και συνεπάγεται βραδύτερη ενζυμική δραστηριότητα, ενώ ο δεύτερος εντοπίζεται στο εξόνιο 4, οδηγεί σε αντικατάσταση ιστιδίνης από αργινίνη (His139Arg, rs2234922) και συνεπάγεται αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου. Ο πρώτος έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη της νόσου σε μελέτες ασθενών-μαρτύρων σε Καυκάσιους και σε Κινέζους [73, 74] και με μειωμένη ικανότητα σωματικής άσκησης των ασθενών [75]. Επιπλέον, ο συνδυασμός οικογενειακού ιστορικού ΧΑΠ με ομοζυγωτία ως προς τον απλότυπο His113/His139 έχει συσχετιστεί με ταχύτερη έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας και με την εμφάνιση της νόσου [76, 77]. Ωστόσο, τα ευρήματα δεν επιβεβαιώνονται σε μελέτες πληθυσμών της Κορέας και της Ιαπωνίας [78, 79], ενώ φαίνεται και ότι η τεχνική της PCR-RFLP οδηγεί σε αποτελέσματα που δεν επιβεβαιώνονται με την τεχνική της αλληλούχησης [80]. Ο δεύτερος συσχετίστηκε με μικρότερο κίνδυνο εκδήλωσης ΧΑΠ σε μελέτη ασθενών-μαρτύρων [81] και με κατεξοχήν ανάπτυξη εμφυσήματος άνω λοβού μεταξύ ασθενών με τη νόσο [82], αλλά τα αποτελέσματα δεν επαναλήφθηκαν [78, 79]. Βέβαια, έχει αναφερθεί και το αντίθετο αποτέλεσμα σχετικά με τον Tyr113His, καθώς σε μελέτη Νορβηγών ασθενών-μαρτύρων η ομόζυγη παρουσία του 113His αλληλίου συσχετίστηκε με προστασία έναντι της νόσου [83]. Επομένως, αν και τα υπεύθυνα για βραδύτερη ενζυμική δραστηριότητα αλληλόμορφα, καθώς και οι συνδυασμοί αυτών στο γονότυπο, φαίνεται ότι ανιχνεύονται συχνότερα σε ασθενείς με ΧΑΠ σε σχέση με υγιείς εθελοντές, οριστικά συμπεράσματα δεν υπάρχουν.

Η ίδια λογική κατεύθυνε και την αναζήτηση της σημασίας των πολυμορφισμών των γονιδίων *GSTM1*, *GSTT1* και *GSTP1* που ευθύνονται για τη δραστηριότητα της τρανσφεράσης της S-γλουταθιόνης (GST). Το συγκεκριμένο ένζυμο καταλύει τη σύζευξη της αναχθείσας γλουταθιόνης (GSH) με διάφορα υδρόφοβα, ηλεκτροφιλικά στοιχεία και συμβάλλει στην αποτοξίνωση του οργανισμού από βλαπτικά συστατικά του καπνού του τσιγάρου και κατ' επέκταση στην αντιοξειδωτική προστασία. Από τις ισομορφές του ενζύμου η *GSTP1*, η οποία παράγεται σε αφθονία σε κυψελίδες, κυψελιδικά μακροφάγα και αναπνευστικά βρογχιόλια, φαίνεται ότι ευθύνεται για το μεγαλύτερο μέρος της δραστηριότητας του. Στο *GSTP1* έχουν περιγραφεί ο πολυμορφισμός Ile105Val, που προκύπτει από μετάπτωση μιας αδενίνης σε γουανίνη στη θέση +313 στο εξόνιο 5 και ένας δεύτερος στο εξόνιο 6, που οδηγεί σε αντικατάσταση αλανίνης από βαλίνη (A114V). Η παρουσία του αλληλομόρφου 105Val συσχετίστηκε με αυξημένη ικανότητα μεταβολισμού αρωματικών εποξειδίων *in vitro* [84]. Το wt αλληλόμορφο (Ile105) συσχετίστηκε με την ανάπτυξη της νόσου σε Ιάπωνες [85], την κατ' εξοχήν εντόπιση του εμφυσήματος στους άνω λοβούς μεταξύ ασθενών με διαπιστωμένο εμφύσημα [82], και σε ομοζυγωτία με την ταχεία έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό νόσου [86]. Αντίθετα, σε Ινδούς διαπιστώθηκε ότι τα αλληλία 105V και 114V, καθώς και ο απλότυπος 105V/114V εμφανίζονταν συχνότερα μεταξύ των ασθενών με ΧΑΠ συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες [77]. Ωστόσο, δεν υπήρξε επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων σε μελέτες σε Κορεάτες [87] και σε Κινέζους [88, 74].

Επιπλέον, στο *GSTM1* έχουν περιγραφεί τρία αλληλόμορφα, από τα οποία το *GSTM1\*0* σε ομοζυγωτία συνεπάγεται πλήρη έλλειψη της πρωτεΐνης, και ο συγκεκριμένος γονότυπος συσχετίστηκε με την ταυτόχρονη παρουσία καρκίνου και εμφυσήματος [89]. Μάλιστα, σε συνδυασμό με ομοζυγωτία του μεταλλαγμένου αλληλίου 113His του *mEPHX* συσχετίστηκε με ευαισθησία στην ανάπτυξη της νόσου σε Σλοβάκους [90], ενώ αντίθετα, σε Κορεάτες δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση με τη νόσο [78]. Αντίστοιχα στο *GSTT1* έχει περιγραφεί μετάλλαξη που συνεπάγεται αδυναμία σύνθεσης της πρωτεΐνης και σε καπνιστές με ελαττωμένη αναπνευστική λειτουργία συσχετίστηκε με ταχύτερη έκπτωσή της [91]. Επιπρόσθετα, η αδυναμία σύνθεσης των *GSTM1* και *GSTT1* σε συνδυασμό με την παρουσία του Ile105 αλληλίου του *GSTP1* έχει συσχετιστεί με ταχεία έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας. Το αποτέλεσμα πιθανά οφείλεται σε πολύ μεγαλύτερη αδυναμία μεταβολισμού συστατικών του καπνού στα συγκεκριμένα άτομα συγκριτικά με τους φορείς ελαττωματικού γονότυπου μόνο σε ένα από αυτά τα γονίδια [86]. Πρόσφατα, με βάση την 11ετή παρακολούθηση Ελβετών, η προαναφερόμενη μετάλλαξη του *GSTT1* σε ομοζυγωτία, με ή χωρίς ταυτόχρονη ομόζυγη παρουσία της αντίστοιχης μετάλλαξης του *GSTM1*, σχετίστηκε με επιτάχυνση της έκπτωσης του FEV<sub>1</sub> σε άντρες, αλλά όχι και σε γυναίκες, ανεξάρτητη του καπνίσματος [92]. Συνολικά τα ευρήματα ενισχύουν την εκτίμηση ότι ο κάθε πολυμορφισμός χωριστά, αλλά και η συνεργική παρουσία τους, προδιαθέτουν γενετικά σε αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού stress και δίνουν ακόμα ένα στοιχείο υπέρ της άποψης της γενετικά καθορισμένης ευαισθησίας στην ανάπτυξη της ΧΑΠ.

Στην αντιοξειδωτική προστασία των πνευμόνων συμβάλλει και η οξυγενάση-1 της αίμης (HMOX1), το ένα από τα δύο ισοένζυμα της οξυγενάσης της αίμης, που διασπώντας την αίμη απελευθερώνει προϊόντα με αντιοξειδωτικές λειτουργίες. Στο 5' άκρο του *HMOX1* ο αριθμός των επαναλήψεων του δινουκλεοτιδίου GT ποικίλει και φαίνεται ότι επηρεάζει το βαθμό μεταγραφής του γονιδίου σε καταστάσεις θερμικού stress. Ο μεγάλος αριθμός των επαναλήψεων ( $n \geq 30$ ) συσχετίστηκε σε Ιάπωνες καπνιστές με την ανάπτυξη εμφυσήματος. Στην ίδια μελέτη εξετάστηκε η δραστηριότητα του προαγωγέα του *HMOX1 in vitro* με έκθεση κυτταρικών σειρών σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και διαπιστώθηκε ότι ήταν μειωμένη όταν ο αριθμός των επαναλήψεων ήταν μεγάλος ( $n=29$ ,  $n=38$ ), γεγονός που προτάθηκε ότι σημαίνει μειωμένη διέγερση της αντιοξειδωτικής δράσης της HMOX1 από τα ROS του καπνού και ευαισθησία στην ανάπτυξη του εμφυσήματος [93]. Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και από μελέτη σε Κινέζους, όπου το όριο συσχέτισης με την εκδήλωση της ΧΑΠ αποτελούσαν οι 32 επαναλήψεις ( $n=32$ ) [80]. Επιπλέον, σε Κινέζους ασθενείς με ΧΑΠ η πολύ σοβαρή νόσος συσχετίστηκε με  $n \geq 32$  [94]. Τέλος, σε Γάλλους καπνιστές κατά τη διάρκεια 8ετούς παρακολούθησης διαπιστώθηκε αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού ( $n \geq 33$ ) με το κάπνισμα και συσχετίστηκε με ταχύτερη έκπτωση των FEV<sub>1</sub> και FEV<sub>1</sub>/FVC [95]. Ωστόσο, τα ευρήματα δεν επιβεβαιώθηκαν από αντίστοιχες μελέτες σε Αμερικανούς [81] και σε Καναδούς [86].

### 1.3.5. Κυτταροκίνες

Στην παθοφυσιολογία της ΧΑΠ αναγνωρίζεται και η σημασία αρκετών κυτταροκινών. Έτσι, έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα  $TNF-\alpha$  στην απόχρεμψη, στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και σε υλικό βιοψίας ασθενών με τη νόσο, καθώς και αυξημένη απελευθέρωσή του από τα κυψελιδικά μακροφάγα των καπνιστών και των ασθενών, και φαίνεται ότι συμβάλλει στην παθογένεσή της διεγείροντας την απελευθέρωση κυτταροκινών της φλεγμονής και επηρεάζοντας τη λειτουργία των λείων μυικών ινών. Στον προαγωγέα του  $TNF-\alpha$  περιγράφεται SNP που προκύπτει από τη μετάπτωση μιας γουανίνης σε αδενίνη (G-308A) και έχει συσχετιστεί με αυξημένη παραγωγή του παράγοντα και με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ασθενειών, όπως η βλεννογονοδερματική λεισμανίαση και η ελονοσία. Αρκετές μελέτες συσχέτισαν το συγκεκριμένο SNP με την ανάπτυξη, τη βαρύτητα και τη θνητότητα της ΧΑΠ σε Καυκάσιους και σε άτομα ασιατικής καταγωγής (πίν. 2). Ωστόσο, τα ευρήματα δεν επαναλήφθηκαν από άλλους ερευνητές σε Ταϊβανέζους [96], Ιάπωνες και Αιγύπτιους [97], Έλληνες, Ιταλούς και άλλους Ευρωπαίους [98, 99, 100]. Τα διαφορετικά αποτελέσματα αποδόθηκαν τόσο σε εθνικές διαφορές όσο και σε ελλειπή σαφήνεια ως προς τον ορισμό των υπό μελέτη φαινοτύπων. Επιπλέον, ο πολυμορφισμός G489A, που έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο του προστάτη και την κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια, βρέθηκε σε μελέτη ασθενών-μαρτύρων σε Ολλανδούς ότι σχετίζεται και με τη ΧΑΠ και μάλιστα με φαινότυπο που δεν συνοδεύεται από ακτινολογικά εμφανείς εμφυσηματικές αλλοιώσεις [101]. Το αποτέλεσμα, όμως, δεν επιβεβαιώθηκε από αντίστοιχες μελέτες σε Ταϊβανέζους, Ιάπωνες και Αιγύπτιους [96, 97]. Στο  $TNF-\alpha$  έχουν μελετηθεί και άλλοι πολυμορφισμοί, οι οποίοι προηγουμένως έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση διαφορετικών νοσημάτων (πχ - G238A με την πολλαπλή σκλήρυνση και G-376A με την ελονοσία), αλλά όχι τόσο εκτεταμένα.

Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί παράλληλα με τους πολυμορφισμούς του  $TNF-\alpha$  συχνά ελέγχονται και πολυμορφισμοί των  $TNF-\beta$  ( $LTA$ ), δεδομένου ότι οι γενετικοί τόποι των δύο εδράζονται στενά συνδεδεμένοι εντός του MHC (6p21.1-6p21.3), των  $TNF-R1$  και  $TNF-R2$ , χωρίς να προκύψει κάποια συσχέτιση με τη ΧΑΠ [100, 102, 103]. Ωστόσο, πολυμορφισμός στο ιντρόνιο 1 του  $LTA$  συσχετίστηκε με φτωχότερη αναπνευστική λειτουργία, που καταδεικνύεται από έκπτωση του FVC [104].

Με το ίδιο σκεπτικό έχει διερευνηθεί και η επίδραση πολυμορφισμών του γονιδίου του  $TGF-\beta_1$ , ο οποίος εμπλέκεται στις διαδικασίες της ανοσιακής απάντησης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, της ιστικής αποκατάστασης και της παραγωγής εξωκυττάριας ουσίας και επηρεάζει την παθοφυσιολογία της ΧΑΠ. Αρχικά, σε Νεοζηλανδούς, διαπιστώθηκε ότι το αλληλλόμορφο που προκύπτει από πολυμορφισμό στο εξόνιο 1 (Leu10Pro, rs1982073) εμφανίζεται πιο συχνά σε υγιείς, καπνιστές και μη, συγκριτικά με ασθενείς με ΧΑΠ και, δεδομένου ότι σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα  $TGF-\beta_1$  στον ορό, συσχετίστηκε ο  $TGF-\beta_1$  και ο πολυμορφισμός με προστασία έναντι της νόσου [105]. Αργότερα, ο ίδιος πολυμορφισμός προτάθηκε ότι συμβάλλει στην υπεραπαντητικότητα των αεραγωγών, αλλά δεν



επιηρεάζει το ρυθμό έκπτωσης του FEV<sub>1</sub>, σε Καναδούς καπνιστές [106], ενώ σε Αμερικανούς συσχετίστηκε, τόσο αυτός όσο και οι πολυμορφισμοί rs1800469 και rs2241712, με ευαισθησία στην ανάπτυξη της ΧΑΠ, βαρύτερη δύσπνοια και σοβαρότερη νόσο [75]. Πρόσφατα, μελέτη σε Ιάπωνες ασθενείς με εμφύσημα επιβεβαίωσε τα ευρήματα αναφορικά με τη συσχέτιση των rs1800469 και rs1982073 με σοβαρότερη νόσο και συσχέτισε ένα συγκεκριμένο απλότυπο του TGF-β<sub>1</sub> με τον εμφυσηματικό φαινότυπο [107]. Ωστόσο, ανάλογα ευρήματα για τον Leu10Pro δεν προέκυψαν από μελέτη σε Ολλανδούς, σε αντίθεση με τον πολυμορφισμό rs6957 που συσχετίστηκε με τη νόσο [108]. Επιπλέον, σε Κορεάτες και Πολωνούς οι προαναφερόμενοι πολυμορφισμοί δεν συσχετίστηκαν με τη ΧΑΠ [109, 110].

Αρκετές μελέτες έχουν γίνει με στόχο την αναζήτηση πιθανής σημασίας πολυμορφισμών και των γονιδίων των ιντερλευκινών στην ανάπτυξη της ΧΑΠ. Έτσι, έχουν μελετηθεί πολυμορφισμοί των γονιδίων των IL-13 και IL-4, που μαζί με το *ADRB2*, εντοπίζονται στην περιοχή 5q31-33, η οποία έχει συσχετιστεί με την υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών και το άσθμα. Ο πολυμορφισμός C-1055T του προαγωγέα του *IL-13*, διαπιστώθηκε ότι εμφανίζεται συχνότερα σε ασθενείς συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες, καπνιστές και μη [111] και θεωρήθηκε ότι προδιαθέτει στην ανάπτυξη ΧΑΠ σε Καυκάσιους. Συσχετίστηκε, επίσης, με επίταση της βλαπτικής δράσης του καπνίσματος επί της αναπνευστικής λειτουργίας, όπως φαίνεται από την μεγαλύτερη έκπτωση του FEV<sub>1</sub> στους φορείς του [112]. Από μελέτες σε Κινέζους προτάθηκε ότι αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου σε καπνιστές χωρίς να αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου [113]. Ωστόσο, σε Ιάπωνες και Αιγύπτιους δεν φάνηκε να σχετίζεται με τη ΧΑΠ [114]. Αναφορικά με τους πολυμορφισμούς -589C/T, -33C/T και VNTR του *IL-4*, μεμονωμένα δεν συσχετίστηκαν στατιστικά με τη ΧΑΠ [111, 114]. Ωστόσο, η μελέτη συνδυασμών απλοτύπων αποκάλυψε σε Ιάπωνες διαφορές στις συχνότητες εμφάνισης των ζευγών *IL-4* -589C/T: *IL-4* VNTR και *IL-4* -33C/T: *IL-4* VNTR ανάμεσα στους ασθενείς και τους υγιείς καπνιστές [114].

Επιπλέον, αναζητήθηκαν συσχετίσεις των πολυμορφισμών του *IL-10* με τη ΧΑΠ, δεδομένης της κατασταλτικής δράσης που εκδηλώνει η IL-10 επί της απελευθέρωσης κυτταροκινών της φλεγμονής από τα ουδετερόφιλα (TNF, IL-8) και τα μονοκύτταρα (TNF, IL-18, IL-6, IL-12) και της επαγωγικής επίδρασής της επί της απόπτωσης των ουδετεροφίλων. Έτσι, από τους πολυμορφισμούς του προαγωγέα, ο A-1082G (rs1800896) συσχετίστηκε με την ανάπτυξη της νόσου σε Γερμανούς [115], και αντίστοιχα ο C-819T (rs1800871) σε Κινέζους [116], ενώ ο A1668T (rs3024492) στο 3ο ιντρόνιο συσχετίστηκε με διαφορετικό ρυθμό έκπτωσης του FEV<sub>1</sub> σε στρατιώτες πυροβολικού [117]. Πρόσφατα, σε ασθενείς με ανεπάρκεια α<sub>1</sub>AT, διαπιστώθηκε ότι οι πολυμορφισμοί rs1800871 και rs1518110 σχετίζονται με την απόφραξη των αεραγωγών και προτάθηκε ότι το *IL-10* επιδρά καθοριστικά στην ανάπτυξη της νόσου σε έδαφος ανεπάρκειας της α<sub>1</sub>AT [118]. Πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι μελέτη σε Καναδούς δεν ανέδειξε συσχέτιση των πολυμορφισμών του *IL-10* με τη ΧΑΠ [119].

**Πίνακας 2:** Μελέτες που ανέδειξαν συσχέτιση του -308A>G πολυμορφισμού του *TNF-α* με τη ΧΑΠ

Μελέτη	Πληθυσμός	Είδος μελέτης	Συσχέτιση
Gingo et al, 2008 [120]	423 καπνιστές, Καυκάσιοι (298 ασθενείς με ΧΑΠ, 125 υγιείς)	Ασθενών-Μαρτύρων	Εκδήλωση ΧΑΠ
Matheson et al, 2006 [121]	1232 κάτοικοι Μελβούρνης	Συγχρονική	Ελαττωμένο FEF25-75%
Hersh et al, 2005 [81]	949 άτομα 127 οικογενειών με πρώιμη εκδήλωση ΧΑΠ (98% λευκοί)	Οικογενειακής συσχέτισης	Ήπια ως σοβαρή απόφραξη Μέτρια ως σοβαρή απόφραξη Μετά βρογχοδιαστολή FEV <sub>1</sub> , FEV <sub>1</sub> /FVC
Sakao et al, 2002 [122]	84 ασθενείς με ΧΑΠ, Ιάπωνες	Μόνο ασθενών (case only)	Αυξημένη έκταση εμφυσηματικών αλλοιώσεων
Sakao et al, 2001 [123]	106 ασθενείς με ΧΑΠ 110 ασυμπτωματικοί καπνιστές 129 δωρητές αίματος (Ιάπωνες)	Ασθενών-Μαρτύρων	Εκδήλωση ΧΑΠ
Keatings et al, 2000 [124]	106 ασθενείς με ΧΑΠ, 99 μάρτυρες	Συγχρονική	Μικρότερη αναστρεψιμότητα της απόφραξης. Μεγαλύτερη θνησιμότητα (από κάθε αίτιο και από ΧΑΠ) (ομοζυγωτία)
Huang et al, 1997 [125]	42 άνδρες με χρόνια βρογχίτιδα 42 υγιείς καπνιστές (Ταϊβάν) 99 παιδιά (51 αγόρια, 48 κορίτσια)	Ασθενών-Μαρτύρων	Ανάπτυξη χρόνιας βρογχίτιδας

Σε συνδυασμό με αυτά, μελετήθηκε και το *IL-1β*, δεδομένης της σημασίας της *IL-1β* στη λειτουργία και χημειοταξία των ουδετεροφίλων και στην υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών. Στον προαγωγέα του *IL-1β* έχουν μελετηθεί δύο πολυμορφισμοί, που συνίστανται σε μετάπτωση κυτοσίνης σε θυμίνη στη θέση -511 (-511C/T) και μετάπτωση θυμίνης σε κυτοσίνη στη θέση -31 (-31T/C), οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης ΧΑΠ και μάλιστα προχωρημένου σταδίου [126, 127], ενώ ο -511C/T φαίνεται ότι επηρεάζει και την ανάπτυξη καχεξίας στην πορεία της νόσου [128]. Επιπλέον, προτάθηκε ότι ένας συγκεκριμένος απλότυπος (CCTC) που φέρει τα αλληλικά κινδύνου τεσσάρων πολυμορφισμών του *IL-1β* (3737C/T, -1464G/C, -511C/T και -31T/C) σχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο σοβαρής ΧΑΠ [127]. Ταυτόχρονα με τους πολυμορφισμούς του *IL-1β* έχει ελεγχθεί και το *IL-1RN* (*IL-1 receptor antagonist*), στο ιντρόνιο 2 του οποίου εντοπίζεται πολυμορφική περιοχή (έξι αλληλικά) που περιέχει 2-8 επαναλήψεις (VNTR) μιας ακολουθίας 86 bp και έχει αναφερθεί συσχέτιση του *IL-1RN*\*2 αλληλίου με μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου [127]. Επιπρόσθετα, η παρουσία του -511T αλληλίου του *IL-1β* ταυτόχρονα με το αλληλίο 1 του *IL-1RN* συσχετίστηκε με επιτάχυνση της έκπτωσης της αναπνευστικής λειτουργίας σε καπνιστές, ενώ ταυτόχρονα με το αλληλίο 2 του *IL-1RN* φάνηκε ότι λειτουργεί προστατευτικά [129]. Ωστόσο τα ευρήματα δεν επιβεβαιώθηκαν στο σύνολο των μελετών [130].

Φυσικά, και άλλα γονίδια ιντερλευκινών και των υποδοχέων τους έχουν μελετηθεί, αν και όχι τόσο εκτεταμένα. Έτσι, στον προαγωγέα του *IL-11* αναγνωρίστηκε μικροδορυφορικός πολυμορφισμός δύο νουκλεοτιδίων, ο οποίος ανιχνεύτηκε με μικρότερη συχνότητα μεταξύ των ασθενών και ιδιαίτερα μεταξύ των μη καπνιστών ασθενών, και εκτιμήθηκε ότι ενδεχομένως ασκεί προστατευτική δράση στην εκδήλωση της ΧΑΠ [131]. Επίσης, δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου της *IL-27*, -964A/G και 2905T/G, συσχετίστηκαν στατιστικά με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου σε Κινέζους [132]. Εξάλλου, κατά την εξέταση του γονιδίου του υποδοχέα της *IL-8-α* (*IL8RA*) οι πολυμορφισμοί M31R και R335C συσχετίστηκαν με την ανάπτυξη ΧΑΠ και παιδικού ασθματος [133], ενώ ο πολυμορφισμός 785C/T του *IL8RB* με προστασία έναντι της ανάπτυξης πνευμονικής φλεγμονής [134]. Αντίθετα, ο πολυμορφισμός -251T/A του προαγωγέα του *IL8* δεν συσχετίστηκε με τη νόσο [135, 134].

Επιπρόσθετα, όσον αφορά τον G-572C πολυμορφισμό του προαγωγέα του *IL-6*, διαπιστώθηκε, σε Ισπανούς, ότι οι γονότυποι που φέρουν το C αλληλίο εμφανίζονται σπανιότερα σε ασθενείς σε σχέση με υγιείς, καπνιστές και μη. Για τους πολυμορφισμούς G-597A και G-174C δεν υπήρξε ανάλογη παρατήρηση. Επίσης, το -572G αλληλίο συσχετίστηκε οριακά με την υποξαιμία ( $PaO_2 < 60$  mmHg) και προτάθηκε ότι το 572C αλληλίο συνεπάγεται μειωμένο κίνδυνο ΧΑΠ. Τέλος, υπήρξε στατιστική συσχέτιση του απλότυπου GCG (-597/-572/-174) με τη νόσο [136]. Αναφορικά με τον πολυμορφισμό G-174C, μελέτη σε Γάλλους συσχέτισε το γονότυπο GG με υψηλότερα επίπεδα *IL-6* στους ασθενείς και υψηλότερη πνευμονική αρτηριακή πίεση [137]. Ωστόσο, άλλες μελέτες απέτυχαν να αναδείξουν συσχέτιση του τελευταίου τόσο με την ανάπτυξη όσο και με το φαινότυπο της ΧΑΠ [115, 128, 138].

### 1.3.6. Άλλα γονίδια

Όπως προαναφέρθηκε, έχει διερευνηθεί και η επίδραση των πολυμορφισμών του γονιδίου του  $\beta_2$ -αδρενεργικού υποδοχέα (*ADRB2*) στην εκδήλωση της ΧΑΠ δεδομένης της θέσης του και του γεγονότος ότι ο συγκεκριμένος υποδοχέας μεσολαβεί φυσιολογικές απαντήσεις των αεραγωγών που περιλαμβάνουν τη βρογχοδιαστολή, αντιφλεγμονώδεις δράσεις, τη βλεννοκροσσική κάθαρση και τη διαπερατότητα του αγγειακού ενδοθηλίου και προηγούμενες μελέτες έχουν συσχετίσει τους πολυμορφισμούς του με μη ειδική υπεραντιδραστικότητα των βρόγχων και απάντηση σε βρογχοδιαστολές σε ασθματικούς ασθενείς. Έτσι, μελέτη σε Κινέζους συσχέτισε τον Arg16Gly με ευαισθησία στην ανάπτυξη της ΧΑΠ και, ανάμεσα στους ασθενείς, την παρουσία του Gln27 αλληλίου με βαρύτερη νόσο [139], ενώ διαφορετικό αποτέλεσμα προέκυψε από μελέτη σε Αιγύπτιους όπου ο Gln27Glu συσχετίστηκε με την ανάπτυξη ΧΑΠ [114]. Μεταγενέστερη μελέτη σε καπνιστές, δεν ανέδειξε συσχέτιση του Arg16Gly πολυμορφισμού με το ρυθμό έκπτωσης της αναπνευστικής λειτουργίας, τη μη ειδική υπεραντιδραστικότητα των βρόγχων και τη βρογχοδιαστολή, ενώ η παρουσία του Gln27Glu πολυμορφισμού σε ετεροζυγωτία φάνηκε ότι λειτουργεί προστατευτικά έναντι της έκπτωσης της αναπνευστικής λειτουργίας [140]. Επιπλέον, μελέτη δείκτου-ελέγχου σε Νορβηγούς δεν ανέδειξε συσχέτιση των δύο πολυμορφισμών του *ADRB2*, Arg16Gly και Gln27Glu, με τη ΧΑΠ [83]. Πρόσφατα, η παρουσία του Arg16 αλληλίου συσχετίστηκε σε Ιάπωνες ασθενείς με ασθενέστερη, επαγόμενη από  $\beta_2$ -αγωνιστές βρογχοδιαστολή και ο απλότυπος Arg16/Gln27 με μικρότερη βρογχοδιαστολή ως απάντηση στη σαλβουταμόλη [141]. Επομένως προς το παρόν δεν υπάρχουν ξεκάθαρα αποτελέσματα όσον αφορά την επίδραση αυτών των πολυμορφισμών στη ΧΑΠ.

Η εκτίμηση της γενετικής επιβάρυνσης στην ανάπτυξη της ΧΑΠ ενισχύεται και από τα ευρήματα που αφορούν τη σχέση της νόσου με αλληλόμορφα του γονιδίου της VDBP (*Gc*-σφαιρίνη). Μεταξύ άλλων λειτουργιών η VDBP θεωρείται και πρόδρομο μόριο του παράγοντα ενεργοποίησης των μακροφάγων και παράγοντας χημειοταξίας των φαγοκυττάρων. Στο *Gc* έχουν περιγραφεί τρία συνεπικρατούντα αλληλίου, τα *Gc\*1F*, *Gc\*1S* και *Gc\*2*, ενώ έχουν ανιχνευθεί >124 σπανιότερα. Σε μελέτες πληθυσμών της Ιαπωνίας, μεταξύ των ασθενών με ΧΑΠ εντοπίστηκαν πιο συχνά ομοζυγώτες ως προς το *Gc\*1F* συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες [142]. Το συγκεκριμένο αλληλίο συσχετίστηκε με μεγαλύτερη έκπτωση του FEV<sub>1</sub>, υψηλότερη συχνότητα LAA>60% και χαμηλότερο CT score των φορέων αυτού ασθενών σε σχέση με τους ασθενείς που έφεραν κάποιο από τα άλλα αλληλίου του *Gc* [143]. Επίσης, σε Ισλανδούς διαπιστώθηκε ότι ασθενείς με υπερέκκριση βλέννης έφεραν συχνότερα το *Gc\*1F* και σπανιότερα το *Gc\*2* αλληλίο, ιδιαίτερα σε ομοζυγωτία [144]. Επιπλέον, σε Καυκάσιους ο γονότυπος με ομοζυγωτία του *Gc\*2* εντοπίστηκε σπανιότερα σε ασθενείς [18, 145], ενώ ο αντίστοιχος με ομοζυγωτία του *Gc\*1F* συχνότερα [146], αλλά και πάλι τα αποτελέσματα αμφισβητήθηκαν [147]. Φαίνεται ότι η πλειοψηφία των αποτελεσμάτων συνηγορεί υπέρ προστατευτικού ρόλου του *Gc\*2* και επιβαρυντικού ρόλου του *Gc\*1F* στην ανάπτυξη της ΧΑΠ.

### 1.3.7. Αστάθεια μικροδορυφορικών DNA-περιοχών

Πρόσφατα, παρατηρήθηκε ότι κύτταρα που απομονώνονται από απόχρεμψη ασθενών εμφανίζουν MSI. Πρόκειται για σύντομες επαναλήψεις νουκλεοτιδίων που απαντώνται διασκορπισμένες σε ολόκληρο το γονιδίωμα ευκαρυωτικών κυττάρων και λειτουργούν ως ρυθμιστικές αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες. Η αστάθειά τους έχει συσχετιστεί με αυξημένη επίπτωση μεταλλάξεων και έχει περιγραφεί σε διάφορες κακοήθειες. Στη ΧΑΠ υπολογίζεται ότι 50% των ασθενών χαρακτηρίζονται από MSI [148], η οποία δεν συσχετίζεται με τη βαρύτητα και τη θνητότητα της νόσου και δεν παρατηρείται σε καπνιστές που δεν έχουν τη νόσο και σε υγιείς μη καπνιστές [149]. Παρατηρείται, ωστόσο, σε ασθενείς με άσθμα, αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό (22%) [148]. Επιπλέον, δεν παρατηρείται σε ρινικά κυτταρικά δείγματα των ασθενών με ΧΑΠ [150], και φαίνεται ότι σχετίζεται με συχνότερες και βαρύτερες παροξύνσεις της νόσου [151]. Ενδεχομένως η ανίχνευση MSI αποτελεί στοιχείο αναγνώρισης καπνιστών “ευαίσθητων” ως προς την ανάπτυξη ΧΑΠ.

## 2. TLRs

Οι TLRs συνιστούν μια εξελικτικά διατηρημένη, αρχαιότατη ομάδα πρωτεϊνών που απαντώνται σε οργανισμούς σε ολόκληρη την κλίμακα της εξέλιξης, από τα φυτά μέχρι τα ανώτερα θηλαστικά. Ο πρώτος υποδοχέας Toll ανακαλύφθηκε στη δροσόφιλα, όπου κατ’ αρχήν αναγνωρίστηκε ως απαραίτητος για τον προσθιοπίσθιο προσανατολισμό του εμβρύου του εντόμου [152]. Στη συνέχεια, στο μονοπάτι μεταβίβασης μηνύματος από τον Toll εντοπίστηκαν ομοιότητες με αυτό που ξεκινά από τον υποδοχέα της IL-1 (IL-1R) σε θηλαστικά. Αποκαλύφθηκε ότι το ενδοκυττάριο τμήμα των δύο υποδοχέων είναι πανομοιότυπο, εξελικτικά διατηρημένο και φέρεται ως πεδίο TIR [153]. Με βάση τις συγκεκριμένες παρατηρήσεις διερευνήθηκε πιθανή σημασία του Toll στην άμυνα της δροσόφιλας. Πράγματι διαπιστώθηκε ότι μεσολαβεί την αντιμυκητιασική άμυνα της ώριμης μύγας [154], χωρίς ωστόσο να αναγνωρίζει απευθείας μοριακούς σχηματισμούς των μυκήτων, ενώ το μονοπάτι μεταβίβασης μηνύματος που ξεκινά από τον Toll κινητοποιείται και από Gram-θετικά βακτήρια. Το 1997 ανακαλύφθηκε ο πρώτος ανάλογος των Toll υποδοχέας σε ανθρώπινα κύτταρα, ο TLR4 [155], και σταδιακά αποκαλύπτονται και νέοι. Μέχρι σήμερα είναι γνωστοί 13 TLRs σε θηλαστικά, από τους οποίους οι TLR1-9 είναι εξελικτικά διατηρημένοι ανάμεσα στον άνθρωπο και στο ποντίκι. Στον άνθρωπο έχουν αναγνωρισθεί 10 λειτουργικοί υποδοχείς (TLR1-10), ενώ ένα κωδικόνιο λήξης στο ανθρώπινο *TLR11* συνεπάγεται καταστολή της έκφρασής του [156].

Οι TLRs είναι *υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων* (PRRs). Αναγνωρίζουν *μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με την παθογονικότητα* (PAMPs) των μικροοργανισμών όσο και *μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με τη βλάβη* (DAMPs) του οργανισμού (πίν.3). Τα DAMPs αντιστοιχούν σε ενδογενείς συνδέτες, όπως οι πρωτεΐνες του θερμικού shock, το ινωδογόνο και νεκρωτικά κυτταρικά λύματα. Η αναγνώριση αυτών από τους TLRs εμπλέκει τους τελευταίους στην παθογένεια αυτοάνοσων νοσημάτων και στις διεργασίες αποκατάστασης της ιστικής βλάβης.

**Πίνακας 3:** Οι συνδέτες των TLRs και η προέλευση τους.

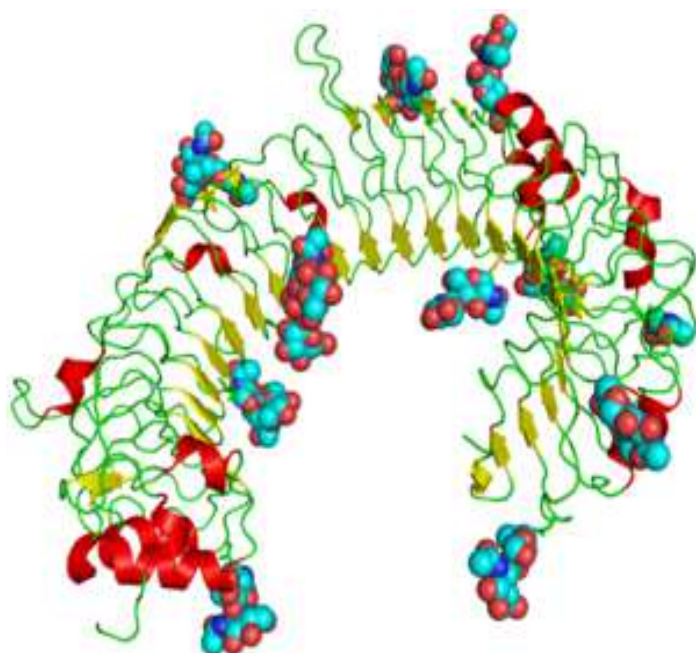
Υποδοχέας	Συνδέτης	Προέλευση συνδέτη
<b>TLR1</b>	Τριακυλλιποπεπτίδια Διαλυτοί παράγοντες	Βακτήρια & μυκοβακτηρίδια <i>Neisseria meningitides</i>
<b>TLR2</b>	Λιποπρωτεΐνη/λιποπεπτίδια	Διάφορα παθογόνα
	Πεπτιδογλυκάνη	Gram-θετικά βακτήρια
	Λιποτειχοϊκό οξύ	Gram-θετικά βακτήρια
	Λιποαραβινομαννάνη	Μυκοβακτηρίδια
	Γλυκοϊνοσιτολικά φωσφολιπίδια	<i>Trypanosoma Cruzi</i>
	Γλυκολιπίδια	<i>Treponema maltophilum</i>
	Πορίνες	<i>Neisseria</i>
	Άτυποι λιποπολυσακχαρίτες	<i>Leptospira interrogans</i>
	Άτυποι λιποπολυσακχαρίτες	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
	Ζυμοζάνη, κονίδια	Μύκητες
<b>TLR3</b>	Μαννάνη	<i>Candida albicans</i>
	Πρωτεΐνη θερμικού shock 70	Ξενιστής
	Δίκλωνο RNA	Ιοί
	Λιποπολυσακχαρίτες (LPS)	Gram-αρνητικά βακτήρια
	Ταξόλη	Φυτά
	Πρωτεΐνη διάχυσης	Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (RSV)
	Πρωτεΐνες φακέλου	Ιός μαστικού καρκίνου ποντικού (MMTV)
	Πρωτεΐνη θερμικού shock 60	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
	Πρωτεΐνη θερμικού shock 60	Ξενιστής
	Πρωτεΐνη θερμικού shock 70	Ξενιστής
<b>TLR4</b>	Τύπου III επανάληψη εξωτερικής περιοχής A της φιμπρονεκτίνης	Ξενιστής
	Ολιγοσακχαρίτες του υαλουρονικού οξέος	Ξενιστής
	Πολυσακχαριτιδικά τμήματα της οξείας ηπαρίνης	Ξενιστής
	Ινωδογόνο	Ξενιστής
<b>TLR5</b>	Φλαγκελίνη	Βακτήρια
<b>TLR6</b>	Διακυλλιποπεπτίδια	Βακτήρια, Μυκόπλασμα
<b>TLR7</b>	Ιμιδαζοκινολίνες	Συνθετικά συστατικά
	Λοξοριμπίνη	Συνθετικά συστατικά
	Βρωπυριμίνη	Συνθετικά συστατικά
	Μονόκλωνο RNA	Ιοί
<b>TLR8</b>	Ιμιδαζοκινολίνη	Σύνθετικά συστατικά
	Μονόκλωνο RNA	Ιοί
<b>TLR9</b>	Μη μεθλιωμένες CpG ακολουθίες	Βακτήρια & ιοί
<b>TLR10</b>	Μη προσδιορισμένος	Μη προσδιορισμένος
<b>TLR11</b>	Μη προσδιορισμένος	Ουροπαθογόνα βακτήρια

Τα PAMPs συνίστανται σε συγκεκριμένα συστατικά των μικροοργανισμών που έχουν διατηρηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης και ευθύνονται για την επιβίωση και την εκδήλωση της λοιμογονικότητά τους. Δεν εντοπίζονται σε ανώτερα όντα και δεν υπόκεινται σε μεταλλαξιμότητα, οπότε δεν διαφεύγουν της αναγνώρισης από τους PRRs. Η παρουσία συγκεκριμένων PAMPs χαρακτηρίζει συγκεκριμένες ομάδες παθογόνων. Οι TLRs χαρακτηρίζονται από ευρεία ειδικότητα ως προς τη σύνδεσή τους, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι TLRs με διαφορετικές ειδικότητες σύνδεσης συχνά αλληλεπιδρούν προκειμένου να επιτευχθεί η μεταβίβαση του μηνύματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η αλληλεπίδραση των TLR1 και TLR2 που επιτρέπει την κινητοποίηση ανοσιακής απάντησης έναντι λιποπεπτιδίων του μυκοβακτηριδίου [157].

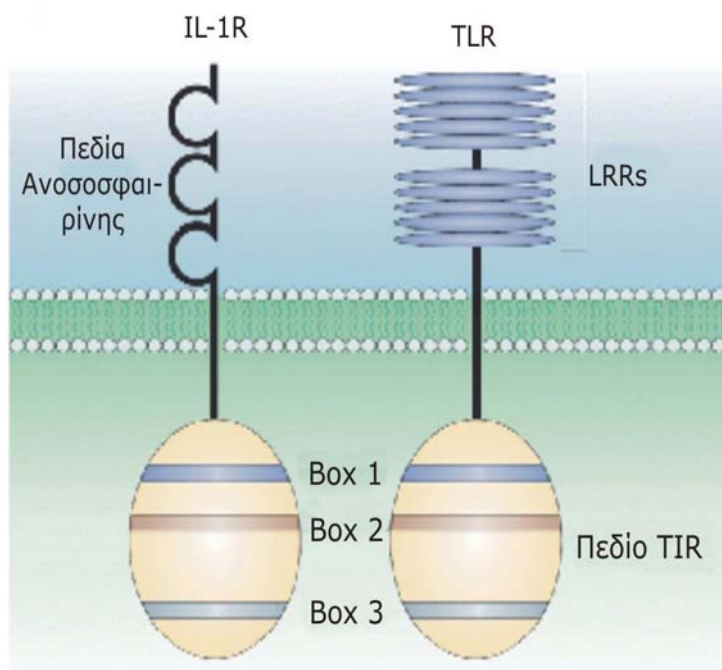
## 2.1. Δομή

Οι TLRs είναι *τύπου 1 διαμεμβρανικοί υποδοχείς* με μοριακά βάρη που κυμαίνονται μεταξύ 90-115 kD. Το εξωκυττάριο τμήμα του καθενός, το υπεύθυνο για την αναγνώριση του συνδέτη, αποτελείται από 19-25 συνεχόμενα αντίγραφα της LRR περιοχής [158]. Τα πρώτα 10 αμινοξέα όλων των LRR περιοχών είναι ίδια και υπεύθυνα για τη δημιουργία μιας β-αλυσίδας. Το υπόλοιπο τμήμα ποικίλει τόσο ως προς την ακολουθία των αμινοξέων όσο και ως προς το μήκος και τη δομή και σχηματίζει μια α-έλικα. Δεδομένου ότι οι α-έλικες είναι πλατύτερες από τις β-αλυσίδες κάθε LRR έχει τελικά τη μορφή θηλιάς και το σύνολό τους στον υποδοχέα έχει πεταλοειδή μορφή. Στα συμπλέγματα LRR-συνδέτη η θέση σύνδεσης εντοπίζεται πάντοτε στην κοίλη επιφάνεια του πετάλου, που δημιουργείται τελικά από τις β-αλυσίδες. Η β-επιφάνεια σε έναν TLR εκτιμάται ότι κυμαίνεται σε επίπεδα 6000-8500 Å<sup>2</sup>, μέγεθος πολύ μεγάλο συγκριτικά με την επιφάνεια σύνδεσης αντιγόνων που φέρουν τα αντισώματα. Το συγκεκριμένο γεγονός ενδεχόμενα συνεπάγεται την ύπαρξη πολλών θέσεων σύνδεσης στην επιφάνεια ενός υποδοχέα και εικάζεται ότι εν μέρει ευθύνεται για την ικανότητα ενός TLR να αναγνωρίζει πληθώρα συνδετών ετερογενών ως προς τη δομή τους. Σε κάθε LRR περιλαμβάνονται 24-29 αμινοξέα και φαίνεται πως οι παρεμβολές αμινοξέων ή άλλες μεταβολές σε συγκεκριμένες θέσεις και ιδιαίτερα μετά το δέκατο πέμπτο αμινοξύ επηρεάζουν την αλληλεπίδραση με τους συνδέτες (εικ. 1).

Αναφορικά με το ενδοκυττάριο τμήμα των TLRs, όπως ήδη α-



**Εικόνα 1:** Η δομή της LRR περιοχής (εδώ η αντίστοιχη του TLR3).



**Εικόνα 2:** Η δομή των TLRs σε σύγκριση με εκείνη των υποδοχέων της οικογένειας του IL-1R.

ναφέρθηκε, φέρεται ως *πεδίο TIR*, είναι πανομοιότυπο με το αντίστοιχο του IL-1R και χαρακτηρίζεται από την παρουσία τριών ομόλογων περιοχών γνωστών ως box 1, -2 και -3. Το πεδίο TIR απαντάται σε διάφορες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως ο IL-1R και ο IL-18R, αλλά και σε πολλές κυτταροπλασματικές προσαρμοστικές πρωτεΐνες, όπως οι MyD88 και TIRAP, οι οποίες συμμετέχουν στη μεταβίβαση του μηνύματος των TLRs. Είναι ενδιαφέρον ότι όλες οι πρωτεΐνες των φυτών και των ζώων που φέρουν το πεδίο TIR εμπλέκονται σε μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή (εικ. 2).

## 2.2. Κυτταρική κατανομή και μεμβρανική έκφραση

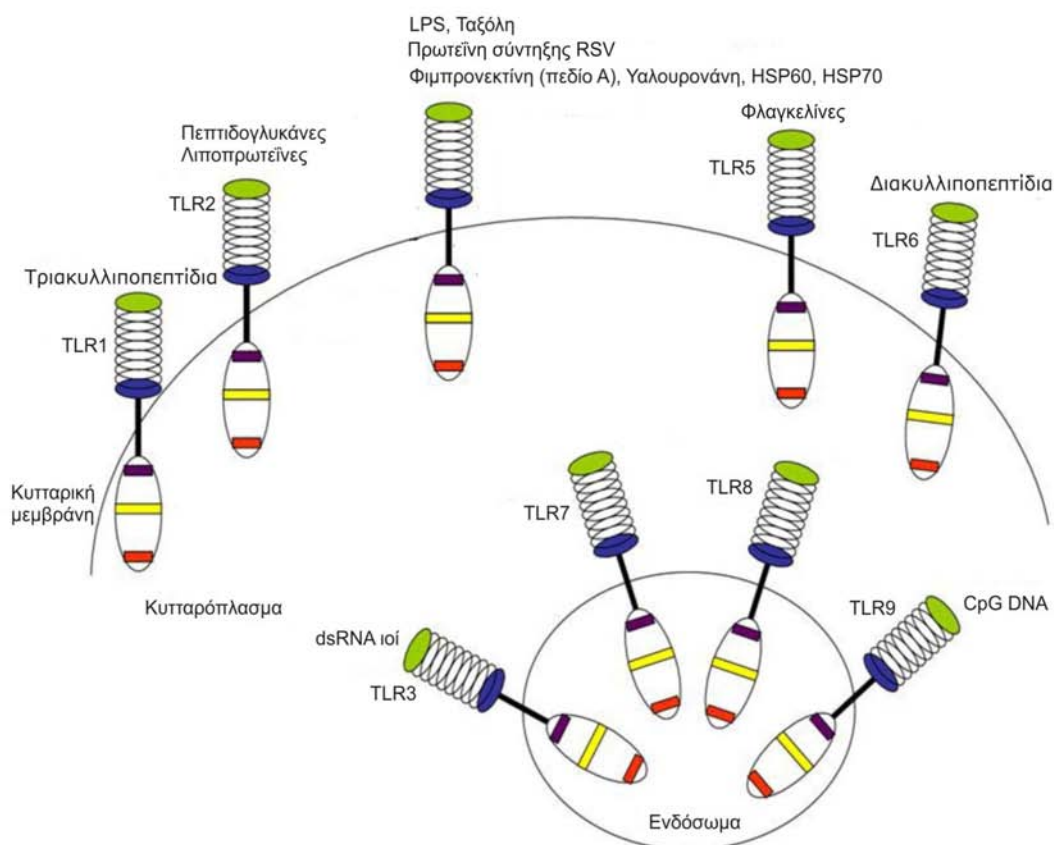
Οι TLRs εκφράζονται από όλα τα ανοσοϊκανά κύτταρα, τα πρότυπα έκφρασης ωστόσο διαφέρουν. Έτσι, για παράδειγμα τα ουδετερόφιλα εκφράζουν όλους τους TLRs εκτός του TLR3, ενώ τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης, την προέλευση και την εντόπισή τους στον οργανισμό (πίν. 4).

**Πίνακας 4:** Έκφραση TLRs από ανοσοκύτταρα.

Ανοσοκύτταρο	TLR	Ανοσιακή απάντηση
Μονοκύτταρα	1, 2, 4, 5, 6, 8	
Μυελοειδή DCs	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8	Παραγωγή IL-12, TNF-α, IL-6
Μακροφάγα	1-9	Καταστροφή στα φαγοσώματα
Κυψελιδικά μακροφάγα	1, 2, 4 / CD14 7, 8	Διατήρηση στείρου του κυψελιδικού διαμερίσματος
Ουδετερόφιλα	Όλοι εκτός του TLR3	Καταστροφή στα φαγοσώματα
Σιτευτικά	2, 4, 6, 8	Απελευθέρωση κυτταροκινών και χημειοκινών
Βασεόφιλα	2, 4, 9, 10	Διέγερση αλλεργικών αντιδράσεων
CD8 DCs	1, 2, 6, 3, 9	Παραγωγή IL-12
Πλασματοκυτταρικά DCs	7, 9, 10	Παραγωγή IFN-α
CD11b DCs	1, 2, 5, 6, 3, 7, 9	Παραγωγή κατασταλτικής IL-10
T-λεμφοκύτταρα	2, 4, 5, 3, 9	Καταστολή από TGF-β
B-λεμφοκύτταρα	1, 2, 6, 7, 9, 10	Παραγωγή αντισωμάτων
Χαμηλή έκφραση	3, 4, 5, 8	



Εκτός από τα ανοσοκύτταρα, οι TLRs εκφράζονται και από άλλους ιστούς, ιδιαίτερα εκείνους που έρχονται σε άμεση επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον, όπως τα επιθήλια και τα ενδοθήλια. Μάλιστα η κατανομή της έκφρασής τους είναι τέτοια ώστε ταυτόχρονα να καθίσταται εφικτή η ανοχή έναντι της ενδογενούς χλωρίδας. Έτσι, για παράδειγμα, στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου ο TLR5 εκφράζεται στην πλαγιοβασική αλλά όχι και στην κορυφαία επιφάνειά τους, ενώ ο TLR4 εμφανίζει χαμηλή έκφραση σε φυσιολογικές συνθήκες, η οποία φαίνεται ότι αυξάνεται σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα. Επαγωγή της έκφρασης των TLRs υπό την επίδραση άσηπτης φλεγμονής έχει επίσης παρατηρηθεί και σε άλλους ιστούς, όπως οι καρδιακές και οι λείες μυϊκές ίνες των αγγείων.

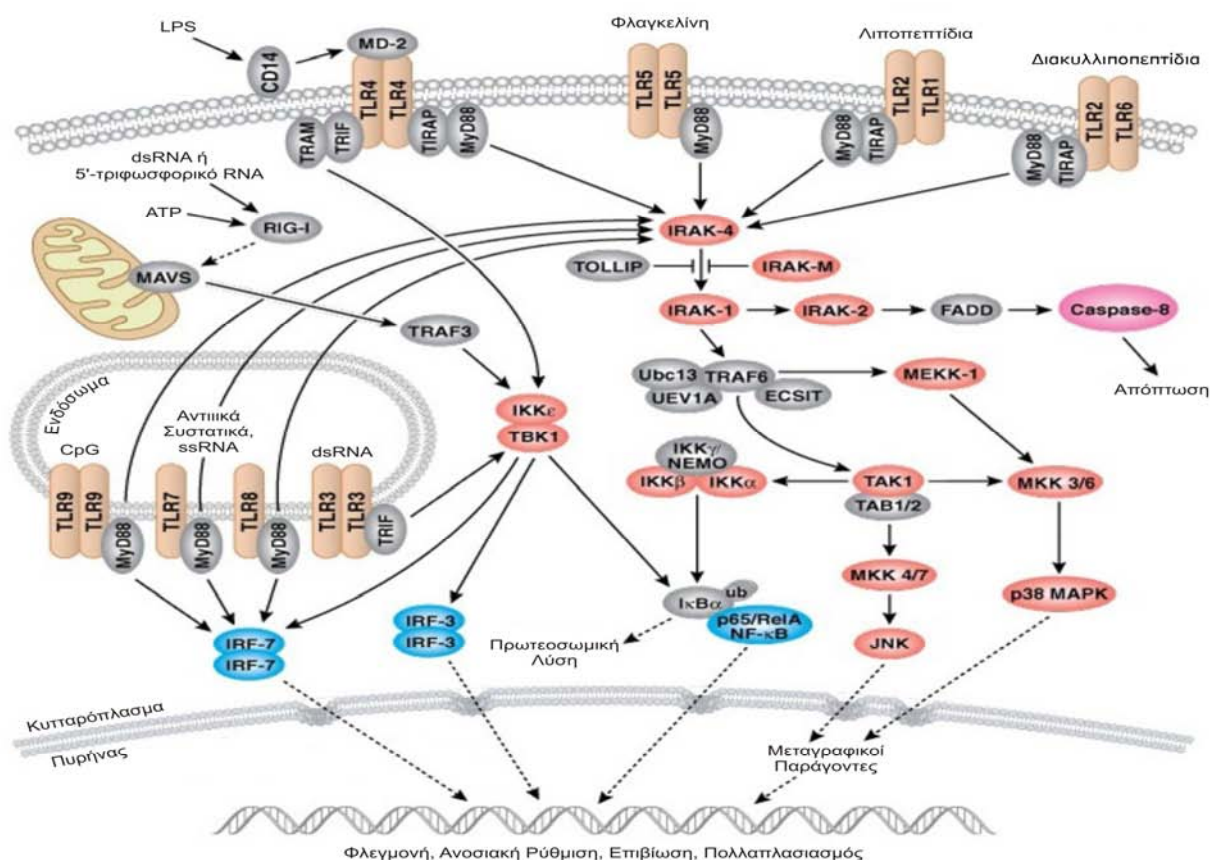


**Εικόνα 3:** Οι συνδέτες και η κατανομή των TLRs στα κυτταρικά διαμερίσματα.

Αναφορικά με την κυτταρική εντόπισή τους οι TLR1, 2, 4, 5, 6 και 11 εκφράζονται στην επιφάνεια, ενώ οι TLR3, 7, 8 και 9 ενδοκυττάρια [159]. Η κατανομή τους στο κύτταρο εξυπηρετεί με τον καλύτερο δυνατό τρόπο το στόχο της απρόσκοπτης και επωφελούς αλληλεπίδρασης με τους συνδέτες. Για παράδειγμα, η ενδοκυττάρια έκφραση του TLR9 στα ενδοσώματα επιτρέπει την επαφή με τυχόν περιεχόμενο ιικό και βακτηριδιακό DNA αποτρέποντας ταυτόχρονα την αναγνώριση του DNA του ξενιστή. Με βάση την ειδικότητα σύνδεσής τους διακρίνουμε τους TLRs 1, 2, 4 και 6 που αναγνωρίζουν λιπίδια, τους TLRs 5 και 11 ως συνδέοντες πρωτεΐνες και τους TLRs 3, 7, 8 και 9 οι οποίοι αναγνωρίζουν νουκλεϊνικά οξέα ιικής ή βακτηριακής προέλευσης (εικ.3).

### 2.3. Σηματοδότηση

Η αναγνώριση του παθογόνου από τον TLR κινητοποιεί ένα μονοπάτι μεταβίβασης μηνύματος εν πολλοίς κοινό για το σύνολο των συγκεκριμένων υποδοχέων (εικ. 4). Αρχικά επάγεται η δημιουργία ομοδιμερών του κάθε υποδοχέα, με την εξαίρεση του TLR2 που σχηματίζει ετεροδιμερή με τον TLR1 και τον TLR6, καθώς και στερεοχημικών μεταβολών των μορίων τους. Αποτέλεσμα είναι η συρροή και η σύνδεση, στο ενδοκυττάριο τμήμα των υποδοχέων, προσαρμοστικών πρωτεϊνών, οι οποίες φέρουν επίσης πεδία TIR. Η σύνδεση συγκεκριμένων κατά περίπτωση προσαρμοστικών πρωτεϊνών καθορίζει, σε σημαντικό βαθμό, την ειδικότητα της μεσολαβούμενης από την TLR-αναγνώριση απάντησης. Όλοι οι TLRs, εκτός του TLR3, χρησιμοποιούν για τη μεταβίβαση μηνύματος το μυελοειδές παράγοντα διαφοροποίησης (MyD88). Η *MyD88-μεσολαβούμενη οδός* επάγει τη φερόμενη ως *πρώιμης φάσης ενεργοποίηση του NF-κΒ*, η οποία οδηγεί στην παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών. Συγκεκριμένα, ακολουθεί η προσέλκυση της σχετιζόμενης με την πρωτεϊνική κινάση σερίνης-θρεονίνης του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1-κινάση (IRAK-4) μετά από αλληλεπίδραση των περιοχών θανάτου. Η τελευταία επάγει τη φωσφορυλίωση της IRAK-1, η οποία συνδέεται με τον παράγοντα που σχετίζεται με τον TNF-υποδοχέα (TRAF-6). Από αυτό το σημείο συνεχίζουν διαφορετικά μονοπάτια. Το ένα οδηγεί, μέσω της κινάσης TAK-1 και του συμπλέγματος IKK, στη διάσπαση του IκΒ και τη μετακίνηση στον πυρήνα του πυρηνικού παράγοντα κΒ (NF-κΒ).



**Εικόνα 4:** Οι οδοί μεταβίβασης μηνύματος από τους TLRs

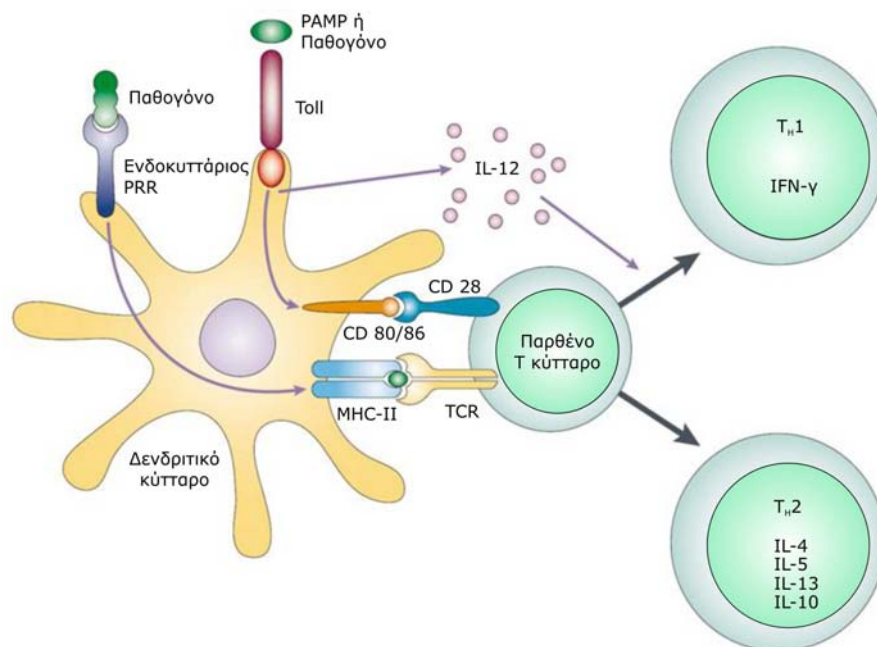
Στο δεύτερο μονοπάτι η ενεργοποίηση των MAP κινασών p38 και JNK καταλήγει στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP-1. Το τρίτο μονοπάτι οδηγεί στην ενεργοποίηση του IRF-5, που επίσης μετακινείται στον πυρήνα. Οι TLR7 και TLR9 σε pDCs μέσω της ίδιας οδού μπορούν να διεγείρουν και την ενεργοποίηση του IRF-7, ο οποίος μετακινείται στη συνέχεια στον πυρήνα και επάγει την παραγωγή IFN-α. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της οδού σηματοδότησης των TLR2 και TLR4 αποτελεί η αναγκαιότητα ενός δεύτερου προσαρμογέα που φέρει πεδίο TIR, της παρόμοιας του MyD88 πρωτεΐνης (TIRAP/Mal), ταυτόχρονα με τον MyD88, προκειμένου για την επιτυχή έναρξη της μεταβίβασης.

Ανεξάρτητα από την *MyD88-μεσολαβούμενη οδό* υπάρχει και η *TRIF-μεσολαβούμενη οδός* η οποία κινητοποιείται από συνδέτες των TLR3, 4, 7 και 9, και επάγει τη φερόμενη ως *βραδείας φάσης ενεργοποίηση του NF-κΒ*. Στη συγκεκριμένη οδό αντίστοιχο του MyD88 ρόλο παίζει ο περιέχων πεδίο TIR προσαρμογέας επάγων την παραγωγή IFN-β (TRIF). Επίσης, προκειμένου για τον TLR4, αντίστοιχο της Mal ρόλο παίζει το σχετιζόμενο με το TRIF μόριο προσαρμογής (TRAM). Η σηματοδότηση μπορεί να καταλήξει σε ενεργοποίηση και μετακίνηση στον πυρήνα τόσο του NF-κΒ, με αποτέλεσμα την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, όσο και των IRF-3 και IRF-7, που επάγουν την παραγωγή IFN-α και την έκφραση γονιδίων επαγόμενων από αυτή.

Είναι φανερό ότι η σηματοδότηση από τους TLRs πρέπει να ρυθμίζεται αυστηρά, ώστε να επιτυγχάνονται οι βέλτιστες ανοσιακές απαντήσεις έναντι παθογόνων, χωρίς να κινητοποιούνται οι μηχανισμοί άμυνας ενάντια στην ενδογενή χλωρίδα και χωρίς να είναι εκσεσημασμένες και τελικά καταστρεπτικές για τον οργανισμό. Η ρύθμιση βασίζεται, όπως ήδη αναφέρθηκε, κατ' αρχήν στην κυτταρική κατανομή τους και ακολούθως στην εκλεκτική χρησιμοποίηση προσαρμοστικών πρωτεϊνών. Σε ενδοκυττάριο επίπεδο ρυθμιστικό ρόλο ασκούν διάφοροι αναστολείς (MyD88s, ST2L, Fliih, IRAK-M, IRAK-1c, β-arrestin), μόρια που διασπούν παράγοντες απαραίτητους για τη σηματοδότηση (SOCS-1, Triad3A) και μόρια που διαταράσσουν τη φωσφορυλίωση άλλων παραγόντων (Tollip). Κατασταλτικό ρόλο είναι δυνατό να παίξουν και κυτταροκίνες, όπως ο TGF-β που προκαλεί διάσπαση του MyD88, ενώ καταστέλλει και την έκφραση του TLR4 [160].

Η μεταβίβαση του μηνύματος από τους TLRs καταλήγει στην ενεργοποίηση πληθώρας διεργασιών, όπως η ενδοκυττάρωση και η φαγοκυττάρωση, η παραγωγή κυτταροκινών, χημειοκινών και τύπου I IFNs, η έκφραση υποδοχέων των χημειοκινών, η ωρίμανση των παρθένων δενδριτικών κυττάρων κ.ά. Δημιουργεί, επίσης, τη γέφυρα σύνδεσης της φυσικής με την ειδική ανοσιακή απάντηση. Αυτό επιτυγχάνεται με την επαγωγή της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων B7.1 (CD80) και B7.2 (CD86) στην επιφάνεια των APCs, τα οποία αλληλεπιδρούν με το CD28 των T-κυττάρων, παρέχοντας έτσι το απαραίτητο δεύτερο μήνυμα για την ενεργοποίηση των τελευταίων. Επιπλέον, η σύνδεση TLRs-PAMPs στα ιστικά μακροφάγα συνεπάγεται την απελευθέρωση IL-12 που κατευθύνει τη διαφοροποίηση των παρθένων βοηθητικών T-κυττάρων προς T<sub>H</sub>1 κύτταρα (εικ. 5). Τέλος, φαίνεται ότι η σηματοδότηση από

τους TLRs επιτρέπει την κινητοποίηση ειδικής ανοσιακής απάντησης επειδή προηγουμένως αποκλείει την κατασταλτική δράση των T-ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) [161, 162]. Τελικά, κύριες συνέπειες της ενεργοποίησης των TLRs είναι η επαγωγή της φλεγμονής και η διαφοροποίηση της ειδικής ανοσιακής απάντησης προς την αποτελεσματικότερη για την αντιμετώπιση του εκάστοτε παθογόνου κατεύθυνση.



**Εικόνα 5:** Η σύνδεση της φυσικής με την ειδική ανοσιακή απάντηση.

#### 2.4. TLR4 και TLR2

Το ενδιαφέρον των μέχρι τώρα ερευνών στρέφεται κυρίως στους TLR4 και TLR2, καταρχήν εξαιτίας του πλήθους και της ετερογένειας των παθογόνων που έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν. Έτσι, ο TLR4 (CD284) αναγνωρίζει πληθώρα συνδετών, με το ενδιαφέρον να εστιάζεται ιδιαίτερα στην αναγνώριση των LPS των Gram-αρνητικών βακτηρίων, εξαιτίας της οποίας διερευνάται εμπλοκή του σε αρκετά νοσήματα (πίν. 3). Η αναγνώριση των LPS επιτυγχάνεται μέσω ενός συμπλέγματος τεσσάρων πρωτεϊνών LBP/CD14/MD-2/TLR4. Ο υποδοχέας CD14, που εντοπίζεται στην επιφάνεια ανοσοϊκανών κυττάρων αλλά και σε διαλυτή μορφή στον ορό, δύναται να συνδέει απευθείας LPS. Ωστόσο, η παρουσία της LBP φαίνεται ότι ενισχύει κατά 100-1000 φορές την αλληλεπίδραση, έτσι ώστε να κινητοποιείται απάντηση με πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις LPS. Ο CD14 στερούμενος ενδοκυττάριου τμήματος αδυνατεί να μεταβιβάσει μήνυμα και για το λόγο αυτό συνδέεται με τη γλυκοπρωτεΐνη μυελικής διαφοροποίησης 2 (MD-2), η οποία με τη σειρά της συνδέεται στην LRR περιοχή του TLR4 και ξεκινά η σηματοδότηση. Η MD-2 φαίνεται ότι είναι απαραίτητη και για τη μετακίνηση του TLR4 από το ενδοπλασματικό δίκτυο/συσκευή Golgi στην κυτταρική επιφάνεια. Στα B-κύτταρα, ειδικά, η αναγνώριση των LPS επιτυγχάνεται με τη λειτουργική αλληλεπίδραση του TLR4 με μια ακόμα πρωτεΐνη επιφάνειας, την RP105, η οποία φέρει μια LRR περιοχή δομικά

ανάλογη αυτής των TLRs. Τελικά ο λειτουργικός υποδοχέας της LPS αναγνώρισης συνίσταται σε ένα μεγάλο σύμπλεγμα πρωτεϊνών. Όσον αφορά τη διάκριση τύπων LPS φαίνεται ότι μεσολαβείται από συγκεκριμένα αμινοξέα σε μια περιοχή που αποτελείται από τα LRR11, LRR12 και το μεγαλύτερο τμήμα του LRR10. Όσον αφορά την αναγνώριση ενδογενών συνδετών, φαίνεται ότι απαιτούνται πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτών για την ενεργοποίηση του TLR4 συγκριτικά με τις ελάχιστες συγκεντρώσεις των LPS που αρκούν για την πυροδότηση της μεταβίβασης του μηνύματος.

Η ευρύτατη ειδικότητα σύνδεσης που χαρακτηρίζει τον TLR2 (CD282) (πίν. 3) αποδίδεται, συνήθως, στην ικανότητά του, μοναδική μεταξύ όλων των TLRs, να δημιουργεί ετεροδιμερή με άλλους TLRs με τους οποίους μοιράζεται δομική συγγένεια. Έτσι, έχει διαπιστωθεί ότι συνδυάζεται λειτουργικά με τον TLR6, προκειμένου να αναγνωρίσει τα διακυλλιποπεπτίδια του μυκοπλάσματος, αλλά και να πυροδοτήσει την ανοσιακή απάντηση στην πεπτιδογλυκάνη του *S. aureus*. Επιπρόσθετα, η λειτουργική αλληλεπίδρασή του με τον TLR1 είναι απαραίτητη για την αναγνώριση των τριακυλλιποπεπτιδίων πληθώρας βακτηρίων και των μυκοβακτηριδίων. Φαίνεται, ότι και στην περίπτωση του TLR2 η ανοσιακή απάντηση χρησιμοποιεί τους υποδοχείς LBP και CD14 [163]. Ωστόσο, μέχρι τώρα δεν είναι ξεκάθαρο αν η δημιουργία των ετεροδιμερών του TLR2 με άλλους TLRs εμφανίζεται αυτόματα ή αν διεγείρεται από την παρουσία των αντίστοιχων μικροβιακών συνδετών. Σε συνδυασμό με αυτά, η ταυτόχρονη διέγερση του TLR2/TLR6 και της Δεκτίνης-1 από το συστατικό του τοιχώματος των μυκήτων ζυμοζάνη, λειτουργεί συνεργικά επί της απελευθέρωσης TNF-α και IL-12 από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Τέλος, έχειδειχθεί ότι ο TLR2 μεσολαβεί τη διέγερση των κυττάρων της φυσικής ανοσίας από οξειδωτικούς παράγοντες, για να ακολουθήσει η απελευθέρωση IL-8 και η προσέλκυση ουδετεροφίλων στο σημείο της βλάβης.

Η σημασία που αποδίδεται στους δύο αυτούς υποδοχείς, και κατ' επέκταση η ταυτόχρονη εξέταση πολυμορφισμών τους στην παρούσα μελέτη, οφείλεται εν πολλοίς και στη συνεργία που χαρακτηρίζει τη λειτουργία τους. Είναι γνωστό, ότι το ίδιο κύτταρο δύναται να κινητοποιεί απάντηση δεχόμενο ενεργοποίηση από διαφορετικούς συνδέτες, δεδομένου ότι φέρει στην επιφάνειά του TLRs με ποικίλες ειδικότητες σύνδεσης. Εξάλλου, το ίδιο παθογόνο μπορεί να ενεργοποιεί ταυτόχρονα διαφορετικούς TLRs, εν προκειμένω τους TLR2 και TLR4, όντας φορέας των αντίστοιχων PAMPs. Επιπλέον, φαίνεται ότι η ανοσιακή απάντηση που επάγεται από συγκεκριμένο συνδέτη σε ένα τύπο κυττάρων ενισχύεται παρακρινώς με την επίδραση μεσολαβητών που απελευθερώνονται από κύτταρα άλλου τύπου, τα οποία έχουν προηγουμένως ενεργοποιηθεί από άλλο TLR-συνδέτη. Σε συνδυασμό με αυτά, η ενεργοποίηση διαφορετικού τύπου κυττάρων από διαφορετικούς TLR-συνδέτες έχειδειχθεί ότι επάγει, τελικά, εντονότερη ανοσιακή απάντηση συγκριτικά με την ενεργοποίηση από ένα συνδέτη [164, 165, 166, 167].

### 3. Γενετική του TLR4

Πρόκειται για τον καλύτερα μελετημένο TLR. Στο γονίδιο του, που εδράζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 9 (θέση 9q32-33), έχουν αναγνωρισθεί αρκετοί SNPs, που ανιχνεύονται με διαφορετικές συχνότητες μεταξύ ατόμων διαφορετικής εθνικής προέλευσης. Για αρκετούς έχει διερευνηθεί πιθανή συσχέτιση με νοσήματα, ωστόσο, σε Καυκάσιους, ενδιαφέροντα ευρήματα αφορούν κυρίως σε δύο από αυτούς. Ο πρώτος προκύπτει από μετάπτωση μιας αδενίνης σε γουανίνη 896 bp (+896) από το σημείο έναρξης της μετάφρασης (A896G, rs4986790), η οποία συνεπάγεται αντικατάσταση ασπαρτικού οξέος από γλυκίνη στη θέση 299 της αμινοξικής αλληλουχίας (Asp299Gly, D299G). Εντοπίζεται στο εξόνιο 4 και επηρεάζει την LRR10. Ο δεύτερος προκύπτει από τη μετάπτωση μιας κυτοσίνης σε θυμίνη στη θέση +1196 (C1196T, rs4986791) και συνεπάγεται την αντικατάσταση θρεονίνης από ισολευκίνη στη θέση 399 (Thr399Ile, T399I). Ιδιαίτερα όσον αφορά την LRR περιοχή, το Asn, που στη συνήθη ακολουθία των LRR-9, -10 και -11 στους TLRs εντοπίζεται στη θέση 10, στον TLR4 αντικαθίσταται από υδρόφοβα αμινοξέα, με αποτέλεσμα το σπάσιμο δεσμών υδρογόνου και τελικά την αύξηση της ευελιξίας της περιοχής. Οι δύο πολυμορφισμοί επηρεάζουν το εξωκυττάριο κομμάτι της πρωτεΐνης, είναι κοινά γενετικώς απομονωμένοι και τα αποτελέσματα αρκετών ερευνών υποστηρίζουν επίδρασή τους στη λειτουργία του υποδοχέα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συχνότητα με την οποία απαντώνται σε Καυκάσιους είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή που διαπιστώνεται σε άτομα κίτρινης φυλής, σε μελέτες των οποίων πολύ συχνά αναφέρεται αδυναμία ανίχνευσής των συγκεκριμένων πολυμορφισμών (πιν. 5). Στη συνέχεια θα αναφερθούν αποτελέσματα μελετών στις οποίες διερευνήθηκε η σημασία της παρουσίας των δύο πολυμορφισμών σε διάφορα νοσήματα.

Αρχικά παρατηρήθηκε ότι οι φέροντες ταυτόχρονα τους δύο πολυμορφισμούς (D299G, T399I), ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες, χαρακτηρίζονταν από ελαττωμένη απαντητικότητα των αεραγωγών σε εισπνεόμενους LPS προερχόμενους από *E. coli*. Η εκτίμηση βασίστηκε στη μέτρηση του FEV<sub>1</sub> και έγινε σε σχέση με τους φέροντες σε ομοζυγωτία το wt αλληλίο. Επίσης, εμφάνιζαν ελαττωμένη έκφραση του TLR4 στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών τους. Μάλιστα, η αποκατάσταση της έκφρασης του wt αλληλίου αποκαθιστούσε την απαντητικότητα σε LPS επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών και κυψελιδικών μακροφάγων προερχόμενων από ετεροζυγώτες [168]. Τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν από μεταγενέστερη μελέτη, η οποία βασίστηκε στην εκτίμηση δεικτών φλεγμονής (αριθμός λευκοκυττάρων περιφερικού αίματος, CRP, LBP). Διαπιστώθηκε συστηματική υποαπαντητικότητα των ετεροζυγωτών φορέων των δύο SNPs μετά από εισπνοή LPS από *E. coli* [169]. Επιπλέον, *in vitro*, 4h μετά από διέγερση PBMCs υγείων ενηλίκων με LPS διαπιστώθηκε μικρότερη απελευθέρωση IL-6 στους φορείς του πολυμορφισμού D299G [170].

**Πίνακας 5:** Συχνότητα πολυμορφικών αλληλίων του *TLR4* σε διάφορους πληθυσμούς.

Φυλή	Εθνικότητα/Χώρα	Μέγεθος δείγματος	Συχνότητα αλληλίου 299G	Συχνότητα αλληλίου 399I	Μελέτη
Καυκάσιοι	Νεοζηλανδοί	188	8.5%	8.5%	Hong et al (2007)
	Λευκοί Αμερικανοί	23	4.5%	4.3%	Benjamin et al (2002)
	Έλληνες	100	3%	1%	Gazouli et al (2005)
	Λευκοί Βέλγοι	139	5%	ΔΠ	Franchimont et al (2004)
	Γερμανοί	145	4%	4%	Torok et al (2004)
	Γερμανοί	116	5.6%	6%	Schmitt et al (2002)
	Γερμανοί	160	5%	ΔΠ	Von Aulock et al (2003)
	Σκωτσέζοι	80	5%	5%	Erridge et al (2003)
	Αμερικανοί	83	6.6%	6.6%	Arbour et al (2000)
	Λευκοί Γάλλοι	73	5.5%	5.5%	Lorenz et al (2002)
	Ιταλοί	810	3.5%	2.9%	Kiechl et al (2002)
	Γερμανοί	199	3.8%	4.8%	Brand et al (2005)
	Ολλανδοί	170	5.3%	ΔΠ	Ouburg et al (2005)
	Σκωτσέζοι	189	8.8%	ΔΠ	Arnott et al (2004)
	Ούγγροι	200	6.3%	ΔΠ	Lakatos et al (2005)
	Άγγλοι	179	5.9%	ΔΠ	Yang et al (2004)
	Αμερικανοί & Άγγλοι	1432	0.84%	ΔΠ	Forrest et al (2006)
	Άγγλοι	1400	5%	ΔΠ	Yang et al (2003)
	Γερμανοί	668	5.46%	ΔΠ	Nieters et al (2006)
	Κροάτες	88	2.27%	2.87%	Boraska et al (2006)
Ισπανικής καταγωγής	Αμερικανοί	24	4%	4.2%	Benjamin et al (2002)
Αφρικανοί	Μαύροι Αμερικανοί	24	15%	6.2%	Benjamin et al (2002)
Ασιάτες	Ιρανοί	111	20.7%	ΔΠ	Rezazadeh et al (2005)
	Ιάπωνες	107	0	ΔΠ	Okayama et al (2002)

ΔΠ: Δεν προσδιορίζεται



Βέβαια, άτομα με ίδιο γονότυπο ως προς το *TLR4* φαινοτυπικά δεν εκδηλώνουν την ίδια απάντηση των αεραγωγών στους LPS, γεγονός που έχει δειχθεί και σε πειραματόζωα [171]. Έτσι, ισχυρή παραμένει η εκτίμηση ότι και άλλα γονίδια μετέχουν στη ρύθμιση της συγκεκριμένης απάντησης. Πρόσφατα, δείχθηκε ότι LPS διαφορετικής βακτηριακής προέλευσης επάγουν διαφορετικές απαντήσεις από PBMCs που φέρουν ή όχι τον πολυμορφισμό D299G. Συγκεκριμένα, παρουσία του πολυμορφισμού, η διέγερση με LPS από *S. typhimurium* επάγει μικρότερη απελευθέρωση IL12p70 και φωσφορυλίωση του IκB-α. Αυτές οι διαφορές δεν παρατηρούνται μετά από διέγερση με LPS από *E. coli* [172]. Ωστόσο, άλλες μελέτες απέτυχαν να επαναλάβουν τα ευρήματα τόσο σε PBMCs όσο και κατά τον *ex vivo* έλεγχο αίματος. Έτσι, μετά από διέγερση με LPS, ενδογενείς και εξωγενείς συνδέτες του TLR4, δεν διαπιστώθηκε διαταραχή της παραγωγής κυτταροκινών (TNF-α, IL-10, IL-1β, IL-6, IFN-γ, GCSF) και CRP παρουσία του D299G πολυμορφισμού [173, 174, 175], οπότε προτάθηκε ότι τα αρχικά ευρήματα πρέπει να αποδοθούν σε άλλα αίτια.

Η πρώτη παρατήρηση αποτέλεσε το έναυσμα για τη διερεύνηση της σημασίας των δύο πολυμορφισμών του *TLR4* στην ανάπτυξη και την έκβαση λοιμώξεων από Gram-αρνητικά βακτήρια. Κατά τη διερεύνηση πιθανής επίδρασης της παρουσίας τους στην ανάπτυξη του σηπτικού shock, ο πολυμορφισμός Asp299Gly εντοπίστηκε μόνο μεταξύ των ασθενών και όχι μεταξύ των μαρτύρων που επιλέχτηκαν. Μάλιστα, για πρώτη φορά απομονώθηκε και ανεξάρτητα από τον Thr399Ile. Επιπλέον, βρέθηκε ότι οι σηπτικοί ασθενείς οι φέροντες τα πολυμορφικά αλληλικά βρίσκονταν σε πολύ μεγαλύτερο κίνδυνο προσβολής από Gram-αρνητικές λοιμώξεις [176]. Τα αποτελέσματα επαναλήφθηκαν αργότερα σε ασθενείς μονάδας εντατικής θεραπείας, όπου διαπιστώθηκε μεγαλύτερη επίπτωση Gram-αρνητικών λοιμώξεων μεταξύ των φορέων των πολυμορφισμών [177]. Εξάλλου, σε ασθενείς μονάδας εντατικής θεραπείας με διαγνωσμένο SIRS η παρουσία του Asp299Gly συσχετίστηκε με σοβαρότερη κλινική εκδήλωση και δυσμενέστερη έκβαση του συνδρόμου [178].

Ακολούθως, αναζητήθηκαν συσχετίσεις με πλήθος λοιμώξεων, κυρίως από Gram-αρνητικά βακτήρια. Έτσι, παρατηρήθηκε ότι μεταξύ ασθενών με οστεομυελίτιδα ανευρίσκονται συχνότερα ομοζυγώτες ως προς τον πολυμορφισμό D299G. Μάλιστα, οι φέροντες αυτόν βρέθηκε ότι είναι περισσότερο ευάλωτοι στην ανάπτυξη Gram-αρνητικής και αιματογενούς οστεομυελίτιδας και, ενδεχομένως, στη χρονιότητα της λοίμωξης. Στην ίδια μελέτη, η ομοζυγωτία ως προς τον D299G συσχετίστηκε με διαταραχή της απάντησης των ουδετεροφίλων σε LPS. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ελαττωμένος ρυθμός αυτόματης και επαγόμενης από LPS απόπτωσης των τελευταίων, μείωση της φωσφορυλίωσης του IκB-α και αδυναμία τους να αυξήσουν την παραγωγή IL-6 μετά από την αντίστοιχη διέγερση [179]. Σε Κινέζους, ο πολυμορφισμός παρατηρήθηκε ότι εμφανιζόταν συχνότερα μεταξύ ασθενών με οξεία παγκρεατίτιδα και παγκρεατική λοίμωξη συγκριτικά με υγιείς εθελοντες. Επίσης, η επίπτωση Gram-αρνητικής λοίμωξης ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με οξεία παγκρεατίτιδα, φορείς του D299G σε σχέση με τους ασθενείς με wt γονότυπο [180]. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η πα-



ρουσία του πολυμορφισμού επηρεάζει την ανοσιακή απάντηση που κινητοποιείται έναντι κολπικών βακτηρίων, τουλάχιστον κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης. Έτσι, έγκυες φορείς του πολυμορφισμού D299G εμφάνισαν πάνω από 10 φορές υψηλότερα επίπεδα αποικισμού με *Gardnerella vaginalis* και δεκαπλάσια αύξηση στην κολπική συγκέντρωση αναερόβιων Gram-αρνητικών βακτηρίων. Μάλιστα, σε ομοζυγώτες παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα κολπικής συγκέντρωσης IL-1 και IL-1 $\alpha$  [181]. Επιπλέον, κατά τον *in vitro* έλεγχο της ανοσιακής απάντησης επιθηλιακών κυττάρων των ούλων μετά από διέγερση με *Porphyromonas gingivalis* διαπιστώθηκε μειωμένη απαντητικότητα των ετερόζυγων ως προς τον D299G κυττάρων σε σχέση με τα wt κύτταρα [182].

Σε αντίθεση με αυτά, μελέτη των δύο πολυμορφισμών του *TLR4* σε ασθενείς με νόσο των Λεγεωναρίων κατέδειξε μειωμένη συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφικών αλληλίων ανάμεσα στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες. Το αποτέλεσμα συνηγορεί υπέρ προστατευτικού ρόλου αυτών στην ανάπτυξη της συγκεκριμένης νόσου [183]. Εξάλλου, αρκετές μελέτες καταλήγουν στο ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της παρουσίας των δύο πολυμορφισμών του *TLR4* με άλλες Gram-αρνητικές λοιμώξεις, όπως με τη μηνιγγιτιδοκοκκική λοίμωξη [184], τον πυρετό Q [185], καθώς και με τη βαρύτητα και έκβαση της σήψης από Gram-αρνητικά βακτήρια [186]. Επομένως, εν πολλοίς τα αποτελέσματα παραμένουν αντιφατικά.

Το γεγονός της αναγνώρισης της πρωτεΐνης σύντηξης του RSV από τον *TLR4* οδήγησε στη διερεύνηση της σημασίας της παρουσίας των δύο πολυμορφισμών του στην ανάπτυξη και εξέλιξη της βρογχιολίτιδας της προκαλούμενης από τον RSV σε παιδιά. Εξάλλου, έχει παρατηρηθεί ότι σε ποντίκια με ανεπάρκεια του υποδοχέα η προσβολή των πνευμόνων από τον ιό παρατείνεται. Πράγματι, οι δύο πολυμορφισμοί D299G και T399I, συσχετίστηκαν με σοβαρή λοίμωξη από RSV σε τελειόμηνα νεογνά στο Ισραήλ [187]. Η επίπτωσή τους ήταν 16,2% και 17,2% αντίστοιχα στα προσβεβλημένα νεογνά και 4,4%, και των δύο, στην ομάδα των μαρτύρων. Επιπλέον, κατά τον έλεγχο PBMCs νεογνών με σοβαρή βρογχιολίτιδα από RSV, που απαιτούσε νοσηλεία σε ΜΕΘ, διαπιστώθηκε ότι εμφάνιζαν μειωμένη απαντητικότητα σε LPS, συγκριτικά με PBMCs νεογνών με ελαφρότερες μορφές της νόσου. Μεταξύ των νεογνών με σοβαρή βρογχιολίτιδα και υποαπαντητικότητα των PBMCs 40% έφερε τον D299G, ποσοστό πολύ μεγαλύτερο από το αντίστοιχο στις ομάδες των νεογνών με ελαφρότερη νόσο (15% και 0%) [188]. Πρόσφατα, εξετάστηκε η επίπτωση των πολυμορφισμών D299G και T399I σε 105 νεογνά υψηλού κινδύνου και μικρά παιδιά, με διαγνωσμένη βρογχιολίτιδα από RSV, στις ΗΠΑ. Τα ποσοστά των ετεροζυγωτών ανέρχονταν στο 89,5% και 87,6% αντίστοιχα και ήταν πολύ μεγαλύτερα συγκριτικά με αυτά που βρέθηκαν στον πληθυσμό των μαρτύρων (10,5% και 6,5% αντίστοιχα) [189]. Ωστόσο, τα προηγούμενα αποτελέσματα αμφισβητήθηκαν από ανάλογη μελέτη ασθενών-μαρτύρων, παιδιών με ή χωρίς λοίμωξη από RSV αντίστοιχα, στον Καναδά, στην οποία ο D299G ανιχνεύτηκε με την ίδια συχνότητα στις δύο ομάδες. Επιπλέον, δεν φάνηκε να επηρεάζει την επαγόμενη από τη διέγερση του *TLR4* παραγωγή κυτταροκινών

[190]. Επίσης, ανάλογη μελέτη σε Ιάπωνες δεν πέτυχε να ανιχνεύσει τους δύο πολυμορφισμούς σε κανένα από τα εξεταζόμενα άτομα [191].

Οι δύο πολυμορφισμοί του *TLR4* έχουν ελεγχθεί και σε σχέση με τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, η οποία θεωρείται πολυπαραγοντική, πιστεύεται ότι εκδηλώνεται σε γενετικό υπόβαθρο και στην οποία πιθανολογείται η συμμετοχή ανοσοϊκανών γονιδίων. Μάλιστα, σε ασθενείς με νόσο του Crohn έχει διαπιστωθεί αυξημένη έκφραση του *TLR4* στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, κάτι που δεν ισχύει για τους *TLR2* και *TLR5*, ενώ η έκφραση του *TLR3* φαίνεται ότι ελαττώνεται. Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες η παρουσία των *TLR4*-SNPs σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για νόσο του Crohn και για ελκώδη κολίτιδα, εύρημα που υποστηρίζεται και από δύο μετα-αναλύσεις (πιν. 6). Μάλιστα, ο κίνδυνος φαίνεται να αυξάνεται με την ταυτόχρονη ύπαρξη συγκεκριμένων πολυμορφισμών στο γονίδιο του ενδοκυττάριου υποδοχέα των μονοκυττάρων για βακτηριακά συστατικά CARD15/NOD2. Ωστόσο, άλλες μελέτες αποκλείουν σημασία των δύο πολυμορφισμών του *TLR4* στην ανάπτυξη φλεγμονώδους νόσου του εντέρου. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά ένα σημαντικό μέρος, αν και όχι στο σύνολό τους, οι τελευταίες αφορούν σε μη ανήκοντες στην καυκάσια φυλή, όπου οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί ανιχνεύονται σπάνια ή και καθόλου [192, 193, 194, 195, 196].

**Πίνακας 6:** Μετα-αναλύσεις μελετών συσχέτισης του Asp299Gly του *TLR4* με τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου.

Μελέτη	Συσχέτιση
Hume GE et al, 2008 [197]	N. Crohn
Browning BL et al, 2007 [198]	N.Crohn και ελκώδης κολίτιδα

Η ίδια λογική κατευθύνει και την αναζήτηση συσχετίσεων της παρουσίας των πολυμορφισμών του *TLR4* με την ανάπτυξη της σαρκοειδωσης. Σε αυτή την αγνώστου αιτιολογίας, συστηματική, κοκκιωματώδη νόσο, παρατηρείται έντονη ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσιακής απάντησης στα προσβεβλημένα όργανα, συνήθως αρχικά στον πνεύμονα. Πιθανολογείται ότι η επίδραση ενός, άγνωστου μέχρι τώρα, εξωγενούς αντιγονικού διεγέρτη σε άτομα γενετικώς προδιατεθειμένα πυροδοτεί την έναρξή της. Ο ρόλος των βακτηρίων εξετάζεται επισταμένως και, κατ' επέκταση, τυχόν εμπλοκή του *TLR4*. Πράγματι, έχει αναφερθεί συχνότερη παρουσία των πολυμορφισμών D299G και T399I μεταξύ ασθενών με χρόνια πορεία της σαρκοειδωσης συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες, όχι όμως και μεταξύ ασθενών με οξεία προσβολή από τη νόσο [199]. Επιπλέον, η ανάλυση των γενετικών τόπων των TLRs σε οικογένειες μέλη των οποίων εμφάνισαν σαρκοειδωση έδειξε σημαντική σύνδεση της νόσου με τόπους του *TLR4*, γεγονός που ενίσχυσε την υπόθεση της σημασίας της παρουσίας των συγκεκριμένων πολυμορφισμών στην ανάπτυξη της νόσου [200]. Ωστόσο, καθώς δεν έχει επαναληφθεί το αποτέλεσμα της πρωτοαναφερόμενης μελέτης, πιθανολογείται και η σημασία άλλων SNPs στο *TLR4* ή κοντά σε αυτό. Εξάλλου, μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό δεν συσχέτισε

τη σαρκοείδωση με τους δύο συγκεκριμένους *TLR4*-SNPs, αλλά με τον C-159T πολυμορφισμό του προαγωγέα του *CD14* [201]. Πρόσφατα, διαπιστώθηκε, κυτταρομετρικά, υψηλότερη έκφραση των *TLR4* και *TLR2* σε PBMCs ασθενών με σαρκοείδωση συγκριτικά με μάρτυρες, γεγονός που συντηρεί το ενδιαφέρον σχετικά με το ρόλο της φυσικής ανοσίας και των συγκεκριμένων υποδοχέων στην παθογένεση της νόσου [202].

Η σημασία των δύο πολυμορφισμών του *TLR4* αναζητείται και στη διαδικασία της αθηρωγένεσης, της ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου και κατ' επέκταση στην εμφάνιση οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου (OEM). Η αθηρωγένεση είναι χρόνια φλεγμονώδης διαδικασία στην οποία φαίνεται ότι συμμετέχουν Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως τα *Chlamydia pneumoniae* και *H. Pylori*. Επίσης οι LPS παίζουν καθοριστικό ρόλο, συμβάλλοντας στην οξειδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL), τη δημιουργία αφρωδών κυττάρων και τη θρομβογένεση. Σε αθηρωματικές πλάκες έχει διαπιστωθεί αυξημένη έκφραση των *TLR1*, *TLR2* και *TLR4*, γεγονός που σχετίζεται με ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κΒ και διέγερση της έκφρασης γονιδίων της φλεγμονής. Διερευνάται, επομένως, η υπόθεση του προστατευτικού ρόλου των *TLR4*-SNPs στη συγκεκριμένη διαδικασία, ως αποτέλεσμα της επαγόμενης διαταραχής της αναγνώρισης των συνδετών του και καταστολής της φλεγμονώδους απάντησης. Εξάλλου η παρουσία του Asp299Gly έχει συσχετιστεί με ελαττωμένη σύνθεση θρομβοξάνης- $A_2$  από τα αιμοπετάλια και προτείνεται πως και με αυτό τον τρόπο δρα προστατευτικά έναντι της ανάπτυξης καρδιαγγειακών επεισοδίων [203]. Αποτελέσματα πληθώρας μελετών, ορισμένες εκ των οποίων πραγματοποιήθηκαν σε μεγάλα δείγματα πληθυσμών, της τάξεως των 3000 ατόμων ή και μεγαλύτερα, υποστηρίζουν τόσο την παραπάνω υπόθεση [204] όσο και την αντίθετη θέση [205]. Επιπλέον, αρκετές μελέτες καταλήγουν σε αδυναμία ανάδειξης συσχέτισης των δύο πολυμορφισμών με την αθηρωγένεση [206], τη στεφανιαία νόσο [207, 208] και την εκδήλωση OEM [209] τόσο σε υγιείς όσο και σε άτομα με οικογενή υπερχοληστεριναιμία [210], καθώς και με το πάχος έσω-μέσου χιτώνα των καρωτίδων [211]. Επίσης, κατά την εκτίμηση της CRP ως ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα τα επίπεδα αυτής στον ορό δεν συσχετίστηκαν με τους συγκεκριμένους δύο πολυμορφισμούς. Πάντως τα αποτελέσματα χρήζουν προσεκτικής ανάλυσης, καθώς οι διαφορές μπορεί να είναι απόρροια των διαφορετικών κριτηρίων με βάση τα οποία συμπεριλαμβάνονται οι ασθενείς στις μελέτες, του διαφορετικού μεγέθους των δειγμάτων, της διαφορετικής εθνικής προέλευσης των συμμετεχόντων και των διαφορών στη στατιστική επεξεργασία.

Σε συνδυασμό με αυτά, οι πολυμορφισμοί του *TLR4* ελέγχονται και σε σχέση με τα φαινόμενα θρόμβωσης που αναπτύσσονται στην πορεία άλλων νοσημάτων. Πρόσφατα, σε ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και συνοδό θρόμβωση διαπιστώθηκε ελαττωμένη επίπτωση των δύο πολυμορφισμών του *TLR4* συγκριτικά με υγιείς δότες, οπότε προτείνεται και πάλι η προστατευτική δράση τους [212]. Το συγκεκριμένο εύρημα αποδίδεται κατ' αρχήν στο γεγονός ότι το μονοπάτι μεταβίβασης μηνύματος από τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα είναι όμοιο με αυτό του *TLR4*, οπότε πιθανολογείται μοριακή μίμηση μεταξύ αντιφωσφολιπι-

δικών και συνδετών του TLR4 και κατ' επέκταση εμπλοκή του στην επαγόμενη από αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα θρόμβωση. Πάντως, στο εργαστήριό μας αυτή η αρνητική συσχέτιση μεταξύ αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων και πολυμορφισμών δεν επιβεβαιώθηκε κατά τη διερεύνηση της σημασίας των τελευταίων στην εκδήλωση θρόμβωσης σε ασθενείς με μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα. Από τη συγκεκριμένη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του πολυμορφισμού Asp299Gly πιθανά δρα προστατευτικά επί της θρομβωτικής διαδικασίας σε αυτούς τους ασθενείς και ιδιαίτερα στους πάσχοντες από ιδιοπαθή θρομβοκυττάρωση. Ωστόσο οι παρατηρούμενες διαφορές δεν έφτασαν τη στατιστική σημαντικότητα [213].

Η σημασία των δύο πολυμορφισμών του *TLR4* αναζητείται και στην ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνου. Τα αποτελέσματα ποικίλουν ανάλογα με την προέλευση των ατόμων και συχνά είναι αντικρουόμενα. Για παράδειγμα, η παρουσία του T399I πολυμορφισμού έχει συσχετιστεί με καρκίνο του στομάχου σε Ιταλούς [214] αλλά όχι σε Μεξικανούς [215]. Σίγουρα απαιτείται εκτενέστερη μελέτη προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Πρόσφατα, διατυπώθηκε η εκτίμηση ότι ο TLR4 έχει κεντρικό ρόλο και στην παθογένεση του σακχαρώδους διαβήτη, καθώς μεσολαβεί την επαγόμενη από λιπίδια ενεργοποίηση της φλεγμονής και αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, και τον οποίο διεκπεραιώνει ενεργοποιώντας τους IKK, JNK, PKC και SOCS3 και διεγείροντας την απελευθέρωση TNF-α και IL-6 [216]. Ο πολυμορφισμός Asp299Gly συσχετίστηκε με ελαττωμένο κίνδυνο ανάπτυξης διαβήτη τύπου II [217]. Καθώς, μάλιστα, ο διαβήτης αποτελεί και παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου, το αποτέλεσμα βρίσκεται σε συμφωνία με συμπεράσματα προαναφερθέντων μελετών υπέρ του προστατευτικού ρόλου του και σε αυτή. Επίσης, οι πολυμορφισμοί Asp299Gly και Thr399Ile, συσχετίστηκαν με μειωμένη συχνότητα περιφερικής νευροπάθειας σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II, αλλά όχι τύπου I, προτείνοντας έμμεσα την ύπαρξη διαφορών στην παθογένεσή της στα δύο νοσήματα [218].

Η δυνατότητα του TLR4 να αναγνωρίζει και ενδογενή σήματα οδήγησε στην αναζήτηση πιθανής εμπλοκής του στην παθογένεση αυτοάνοσων νοσημάτων. Η σχετική με τους πολυμορφισμούς του έρευνα καταλήγει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Έτσι, από ορισμένες μελέτες δεν προέκυψε συσχέτιση αυτών με τον κίνδυνο ανάπτυξης ρευματοειδούς αρθρίτιδας (RA), ιδιοπαθούς νεανικής αρθρίτιδας και ΣΕΛ [219, 220, 221] σε Καυκάσιους. Ωστόσο, από τους Radstake et al ο Asp299Gly συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο RA [222], ενώ από τους Roelofs et al με ελαττωμένη απελευθέρωση IL-6, TNF-α και IL-10 από PBMCs ασθενών με RA [223].

Σε συνδυασμό με αυτά, εξετάζεται ο ρόλος του TLR4 στην ανάπτυξη της νόσου του Alzheimer, δεδομένου ότι ευρήματα μελετών συνηγορούν υπέρ της συμμετοχής του σε νευροεκφυλιστικές διεργασίες. Ο TLR4 εκφράζεται από τη μικρογλοία και έχειδειχθεί ότι η παρουσία του είναι απαραίτητη για την επαγόμενη από LPS βλάβη των ολιγοδενδριτικών κυττάρων σε μεικτές καλλιέργειες. Επιπλέον, σε πειραματόζωα με μετάλλαξη του *TLR4* διαπιστώθηκε αντίσταση στην ανάπτυξη βλάβης των νευρώνων από LPS. Πρόσφατα, παρατηρήθηκε

πως η έκφραση του TLR4 αυξάνεται σε νευρώνες που εκτίθενται σε β-αμυλοειδές και πως η αντίστοιχη διέγερση και η σηματοδότηση μέσω του TLR4 διεγείρει την απόπτωση των νευρώνων, ενώ η μετάλλαξή του ασκεί προστατευτική δράση έναντι της απόπτωσης [224]. Εξάλλου, σε πειραματόζωα, δείχθηκε ότι ο TLR4 μεσολαβεί και την αύξηση των κυτταροκινών στον εγκέφαλο στη νόσο του Alzheimer [225]. Όσον αφορά την επίδραση των πολυμορφισμών του στην ανάπτυξη της νόσου, η παρουσία του Asp299Gly διαπιστώθηκε ότι είναι συχνότερη μεταξύ υγιών μαρτύρων συγκριτικά με ασθενείς με όψιμη εκδήλωση της νόσου του Alzheimer [226], γεγονός που υποδηλώνει προστατευτικό ρόλο του πολυμορφισμού του σε αυτή.

Η φλεγμονώδης ανοσιακή απάντηση που αναπτύσσεται στην περιοδοντίτιδα τόσο κατά την οξεία εισβολή αυτής όσο και κατά τη χρόνια εξέλιξή της, κινητοποίησε την αναζήτηση συμμετοχής των TLRs στην παθογένεσή της, δεδομένου μάλιστα ότι αναγνωρίζεται πως υπάρχει γενετικό υπόβαθρο. Η σχετική έρευνα αφορά συνήθως ταυτόχρονα τον TLR4 και τον TLR2, καθώς για την ανάπτυξη της νόσου ενοχοποιούνται τόσο Gram-αρνητικά βακτήρια όσο και η *Porphyromonas gingivalis* που έχειδειχθεί ότι αναγνωρίζεται από τον TLR2. Στην πλειοψηφία τους οι σχετικές μελέτες καταδεικνύουν απουσία συσχέτισης των *TLR4*-SNPs και του *TLR2*-Arg753Gln με την οξεία και τη χρόνια νόσο τόσο σε Καυκάσιους [227, 228, 229] όσο και σε άτομα ασιατικής καταγωγής [230, 231]. Εντούτοις, και πάλι δεν υπάρχει ομοφωνία. Έτσι, οι δύο πολυμορφισμοί του *TLR4* εμφανίζονται να αποτελούν παράγοντες κινδύνου για τη χρόνια νόσο σε μελέτη των Schröder et al σε Γερμανούς [232]. Αντίθετα, από τους James et al προτείνεται ότι ο Asp299Gly λειτουργεί προστατευτικά έναντι της ανάπτυξης οξείας περιοδοντίτιδας [233]. Επομένως περαιτέρω έλεγχος απαιτείται προκειμένου να εξαχθούν αδι-αμφισβήτητα συμπεράσματα.

Η σημασία της TLR σηματοδότησης, και κατ'επέκταση της παρουσίας των πολυμορφισμών του *TLR4*, εξετάζεται και σε σχέση με την οξεία και χρόνια απόρριψη μοσχεύματος σε μεταμοσχευμένους ασθενείς. Έχει διαπιστωθεί ότι, μετά από μεταμόσχευση καρδιάς, λήπτες με δυσλειτουργία του ενδοθηλίου εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα mRNA και επιφανειακής έκφρασης των TLR4 και B7-1 των περιφερικών μονοκυττάρων και απελευθέρωση IL-12 και TNF-α σε σχέση με υγιείς λήπτες. Αντίθετα, λήπτες που επιβίωσαν για διάστημα >6ετών δεν παρουσιάζουν αύξηση της έκφρασης του TLR4 και των μεσολαβητών της δράσης του, συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες,. Επιπλέον, σε πειραματόζωα, η οξεία ή χρόνια απόρριψη μοσχεύματος συσχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα mRNA των TLR4 και B7-1 [234]. Κατ'επέκταση, η παρουσία των μεταλλαγμένων αλληλίων, μεμονωμένων ή σε συνδυασμό, σε λήπτες πνευμονικού μοσχεύματος συσχετίστηκε με ελαττωμένο κίνδυνο οξείας και χρόνιας απόρριψης, ενώ η παρουσία τους στους δότες δεν φάνηκε να επηρεάζει την έκβαση [235, 236]. Ωστόσο, η έρευνα σχετικά με τη σημασία τους στην έκβαση μεταμοσχεύσεων νεφρού καταλήγει σε διαφορετικά συμπεράσματα. Έτσι, από τους Palmer et al (2006) υποστηρίχθηκε ότι η παρουσία τους σε ετεροζυγωτία στους δότες νεφρικών μοσχευμάτων σχετίζεται με μειωμένο

κίνδυνο απόρριψης του μοσχεύματος, ενώ η παρουσία τους στους λήπτες δεν επηρεάζει την εξέλιξη [237]. Ωστόσο, από τους Ducloux et al (2005) συσχετίστηκε η παρουσία τους στους λήπτες με μειωμένο κίνδυνο απόρριψης και ανάπτυξης αθηρογένεσης, καθώς και με υψηλότερη συχνότητα προσβολής από κυτταρομεγαλοϊό, βαριές βακτηριακές και ευκαιριακές λοιμώξεις [238]. Σε αντίθεση με αυτά, από τους Nogueira et al (2007) δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση της παρουσίας των πολυμορφισμών με την απόρριψη μοσχεύματος μετά από νεφρική μεταμόσχευση [239]. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και αναφορικά με την έκβαση μεταμόσχευσης ήπατος μετά από ηπατίτιδα C [240]. Επιπρόσθετα, σε μεταμόσχευση πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων η παρουσία των πολυμορφισμών του *TLR4* τόσο στους δότες όσο και στους λήπτες συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης νόσου μοσχεύματος έναντι ξενιστή και αυξημένο κίνδυνο Gram-αρνητικής βακτηριαιμίας, αν και η διαφορά δεν έφτασε τη στατιστική σημαντικότητα [241], ενώ η παρουσία τους στους δότες συσχετίστηκε με κίνδυνο διηθητικής ασπεργίλλωσης σε μη συγγενικούς λήπτες [242].

Οι συνέπειες της παρουσίας των D299G και T399I πολυμορφισμών του *TLR4* έχουν διερευνηθεί και σε σχέση με αρκετά ακόμα νοσήματα, αν και όχι τόσο εκτεταμένα. Στην κοιλιοκάκη, για παράδειγμα, τα πεπτίδια της γλουτένης γλιαδίνη και γλουτενίνη έχειδειχθεί ότι δρουν ως αντιγόνα που κινητοποιούν αυτοάνοση απάντηση έναντι του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου. Μεταλλάξεις διαφόρων γονιδίων της φυσικής ανοσίας και του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας φαίνεται ότι συμβάλλουν στη διαμόρφωση φαινοτυπικά ευάλωτων ατόμων. Ωστόσο, από τη μοναδική μελέτη που είναι διαθέσιμη, δεν προκύπτει συσχέτιση της παρουσίας των δύο πολυμορφισμών του *TLR4*, με την ανάπτυξη της νόσου [243]. Η ευρεία ειδικότητα σύνδεσης του TLR4 και ο κεντρικός ρόλος του στη μεταβίβαση μηνύματος από πλήθος παθογόνων, κατεύθυνε και την αναζήτηση πιθανής σημασίας των πολυμορφισμών του στην ανάπτυξη ασπεργίλλωσης. Πράγματι, η παρουσία του μεταλλαγμένου αλληλίου 299Gly συσχετίστηκε με την ανάπτυξη του ασπεργιλλώματος σε μελέτη σε Καυκάσιους. Από την τελευταία δεν προέκυψε σημασία της παρουσίας πολυμορφισμού του *TLR2*, παρά το ότι ο τελευταίος γενικά θεωρείται υπεύθυνος για την αναγνώριση μυκήτων [244]. Βέβαια, στις συγκεκριμένες περιπτώσεις των μοναδικών μελετών τα αποτελέσματα μένει να επαναληφθούν στο μέλλον.

Η κυρίαρχη εκτίμηση ότι το άσθμα αποτελεί συνέπεια της επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων σε άτομα γενετικώς προδιατεθειμένα και ο κεντρικός ρόλος που αποδίδεται, με βάση την υπόθεση της υγιεινής, στην ενδοτοξίνη κατεύθυνε και τη διερεύνηση της επίδρασης της παρουσίας των πολυμορφισμών D299G και T399I στην εκδήλωση άσθματος και ατοπίας. Αρχικά σε μελέτη 589 οικογενειών της νότιας Αμερικής και 167 οικογενειών του Κεμπέκ δεν διαπιστώθηκε συσχέτισή τους με την εκδήλωση ασθματικού φαινότυπου [245], και το αποτέλεσμα επαναλήφθηκε σε νεαρούς Δανούς αγρότες [246]. Μελέτη σε γερμανικό πληθυσμό, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι συμμετέχοντες με wt γονότυπο είχαν αυξημένο κίνδυνο άσθματος με εντονότερη έκθεση στην ενδοτοξίνη, σε αντίθεση με τους φέροντες τους δύο πο-

λυμορφισμούς που εξετάζουμε [247]. Αργότερα, η βαρύτητα της ατοπίας σε ασθματικούς συσχετίστηκε με την παρουσία του πολυμορφισμού Asp299Gly σε μελέτη οικογενειών με ασθματικά μέλη, αλλά και πάλι δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση με τον κίνδυνο εκδήλωσης άσθματος [248]. Ωστόσο, σε σουηδικής καταγωγής παιδιά σχολικής ηλικίας ο Asp299Gly συσχετίστηκε με υψηλότερη επίπτωση άσθματος, αλλά όχι και αλλεργικής ρινοεπιπεφυκίτιδας. Από την ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι PBMCs φορέων του πολυμορφισμού απελευθερώνουν χαμηλότερα ποσά IL-12 και IL-10 σε απάντηση στην ενδοτοξίνη σε σχέση με wt κύτταρα [249]. Αργότερα, σε ασθματικά παιδιά στην Τουρκία η παρουσία και των δύο πολυμορφισμών συσχετίστηκε με ηπιότερες μορφές της ασθένειας [250]. Επιπλέον, η παρουσία του Asp299Gly σε συνδυασμό με πολυμορφισμό του *IL-4* (-590C/T) φάνηκε ότι αυξάνει τον κίνδυνο άσθματος σε Φιλλανδές [251]. Πρόσφατα, ωστόσο, οι δύο πολυμορφισμοί συσχετίστηκαν με εξαιρετικά ελαττωμένο κίνδυνο αλλεργικού κατάρρου σε μελέτη που αφορούσε σε μη καπνιστές φοιτητές, ενώ συσχέτιση αυτών με εκδήλωση ατοπίας παρατηρήθηκε μόνο στις γυναίκες [252]. Φαίνεται ότι οι διαφορετικές προσεγγίσεις δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα και προς το παρόν δεν είναι δυνατό να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Οι λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος, συχνά προκαλούμενες από Gram-αρνητικά βακτήρια, αποτελούν γνωστό παράγοντα κινδύνου για πρόωρο τοκετό. Κατ' επέκταση, η παρουσία των πολυμορφισμών του *TLR4* ενδέχεται να εμπλέκεται στην πρόκλησή του. Πράγματι, σε φιλλανδικό πληθυσμό, διαπιστώθηκε συχνότερη παρουσία του 299Gly αλληλίου μεταξύ πρόωρων νεογνών και μητέρων πρόωρων σε σχέση με τα τελειόμηνα και τις μητέρες αυτών, οπότε συσχετίστηκε με πρόωρο τοκετό [253]. Επιπλέον, πρόσφατα, η παρουσία του πολυμορφισμού Asp299Gly σε έμβρυα συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο σοβαρής προωρότητας (<33 εβδομάδες κύησης) και με πρόωμη ρήξη των υμένων σε πληθυσμό της Ουρουγουάης [254]. Αντίθετα, σε Αμερικανούς αφρικανικής καταγωγής [255], καθώς και σε ένα γερμανικό πληθυσμό [256] δεν διαπιστώθηκε συσχέτισή του με την πρόωρη ρήξη των υμένων. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η προεκλαμψία, στην οποία παρατηρείται εκσεσημασμένη φλεγμονώδης απάντηση της μητέρας στην εγκυμοσύνη με έντονη ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας, δεν φάνηκε να συσχετίζεται με την παρουσία των δύο πολυμορφισμών του *TLR4*, τόσο κατά το χρόνο εκδήλωσης και τη βαρύτητά της, όσο και κατά την επαγωγή ή όχι περιορισμού της ανάπτυξης του εμβρύου [257].

Σε συνδυασμό με αυτά, ο *TLR4* φαίνεται ότι εμπλέκεται και στην ανοσιακή απάντηση έναντι του *H. pylori*. Πρόσφατα, σε παιδιά, η λοίμωξη από *H. pylori* και η ανάπτυξη δωδεκαδακτυλικού έλκους δεν φάνηκε να επηρεάζεται από την παρουσία των πολυμορφισμών του *TLR4*, η οποία ωστόσο συσχετίστηκε με προσβολή από *cagA*-θετικά στελέχη του βακτηρίου και ενδεχόμενα με βαρύτερες επιπτώσεις της λοίμωξης κατά την ενήλικη ζωή [258]. Επίσης, οι δύο πολυμορφισμοί δεν συσχετίστηκαν με την ανάπτυξη δωδεκαδακτυλικού έλκους ή γαστρίτιδας σε *H. pylori*-θετικά άτομα σε μελέτη σε ουγγρικό πληθυσμό [259]. Αντίθετα, σε Μεξικανούς, συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο σοβαρών παθήσεων που σχετίζονται με την *H.*

*pylori* λοίμωξη, όπως το δωδεκαδακτυλικό έλκος και ο καρκίνος του στομάχου, καθώς και με διαφορετικά πρότυπα έκφρασης κυτταροκινών [260], αναδεικνύοντας την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης.

#### 4. Γενετική του TLR2

Το γονίδιο του TLR2 εδράζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 4 (4q31.3) Η ευρύτατη ειδικότητα σύνδεσης του συγκεκριμένου υποδοχέα και, κατ' επέκταση, η εμπλοκή του στην αναγνώριση μικροβιακών συστατικών πληθώρας μικροβίων οδήγησε στη διερεύνηση πιθανής συμμετοχής του στη παθογένεση διαφόρων νοσημάτων. Στα πλαίσια αυτά, αναπτύχθηκε σημαντική έρευνα γύρω από τους πολυμορφισμούς του γονιδίου του. Μεταξύ των πολυμορφισμών που αναγνωρίστηκαν, συχνότερα σε Καυκάσιους ανιχνεύεται ο Arg753Gln (R753Q, rs5743708), ο οποίος προκύπτει από μετάπτωση γουανίνης σε αδενίνη (G>A) 2258 bp από το σημείο έναρξης της μετάφρασης (+2258) και συνεπάγεται την αντικατάσταση αργινίνης από γλουταμίνη στη θέση 753 της αμινοξικής αλληλουχίας. Εντοπίζεται στο εξόνιο 2 και επηρεάζει το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Ακολουθώς θα παρουσιαστούν αποτελέσματα μελετών γενετικής συσχέτισης, στις οποίες διερευνήθηκε η σημασία της παρουσίας του συγκεκριμένου πολυμορφισμού σε διάφορα νοσήματα.

Ο πολυμορφισμός Arg753Gln του *TLR2* αρχικά συσχετίστηκε ασθενώς με σηπτικό shock προκαλούμενο από *S. aureus*. Επιπλέον, *in vitro*, διαπιστώθηκε ότι κύτταρα που έφεραν τον πολυμορφισμό χαρακτηρίζονταν από υποαπαντητικότητα σε πεπτίδια προερχόμενα από *B. burgdorferi* και *T. pallidum* [261]. Σε μεταγενέστερες μελέτες, όμως, η συσχέτιση δεν επαναλήφθηκε, τόσο σε ένα πληθυσμό ασθενών με σοβαρές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις (σηπτική αρθρίτιδα, λοίμωξη μαλακών μορίων με σηψαιμία, πνευμονία, σύνδρομο τοξικού shock κ.α.) [262] όσο και σε ένα πληθυσμό με οστεομυελίτιδα [179]. Τα τελευταία ευρήματα έρχονται σε συμφωνία και με την *in vitro* παρατήρηση ότι η παρουσία ενός wt αλληλίου στο γονίδιο του TLR2 αρκεί για τη φυσιολογική παραγωγή κυτταροκινών μετά από διέγερση κυττάρων με λιποτειχοϊκό οξύ προερχόμενο από *S. aureus* [263].

Όπως είναι γνωστό ο TLR2 μεσολαβεί τις κυτταρικές απαντήσεις έναντι του *M. tuberculosis* και το μπλοκάρισμά του συνεπάγεται αδυναμία των μακροφάγων να αναγνωρίσουν και να απαντήσουν σε πεπτίδια του μυκοβακτηριδίου. Επιπλέον, *in vitro*, έχειδειχθεί ότι η ενεργοποίησή του οδηγεί στην ενδοκυττάρια θανάτωση του *M. tuberculosis* από τα κυψελιδικά μακροφάγα. Σε συμφωνία με αυτά, το πολυμορφικό αλληλίο 753Gln διαπιστώθηκε ότι εμφανίζεται συχνότερα μεταξύ ασθενών με φυματίωση σε σχέση με υγιείς μάρτυρες, οπότε προτάθηκε ότι ο πολυμορφισμός Arg753Gln σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου [264]. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα υπογραμμίζει τη σημασία του γενετικού υπόβαθρου στην εκδήλωση της φυματίωσης. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν προκύψει και σχετικά με πολυμορφισμούς άλλων γονιδίων, όπως του υποδοχέα της βιταμίνης D και κυτταροκινών (IL-10, IL-6, IFN-γ και TNF-α), η παρουσία των οποίων φαίνεται, επίσης, ότι επηρεάζει την εκ-



δήλωση της φυματίωσης [265]. Ωστόσο, πρόσφατα, σε άτομα που είχαν προηγουμένως εμβολιαστεί με BCG (Bacille Calmette-Guérin) δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση της παρουσίας του πολυμορφισμού Arg753Gln με την επαγόμενη ανάπτυξη υπερευαισθησίας επιβραδυνόμενου τύπου στη χορήγηση κεκαθαρμένης πρωτεΐνης του μυκοβακτηριδίου [266].

Η σημασία της παρουσίας του πολυμορφισμού Arg753Gln διερευνάται σε σχέση με πληθώρα λοιμωδών νοσημάτων, εξαιτίας της ικανότητας του TLR2 να κινητοποιεί απαντήσεις έναντι πλήθους μικροβίων. Έτσι, εξετάστηκε σε σχέση με την ανάπτυξη της νόσου του Lyme. Η νόσος προκαλείται από τη *Borrelia burgdorferi*, πρωτεΐνες της εξωτερικής επιφάνειας της οποίας αναγνωρίζονται μέσω του ετεροδιμερούς TLR2/TLR1. Διαπιστώθηκε ελαττωμένη επίπτωση του πολυμορφισμού μεταξύ των ασθενών με τη νόσο σε σχέση με υγιείς μάρτυρες, με τη διαφορά να είναι πιο εμφανής σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου. Επομένως, προτάθηκε ότι η παρουσία του Arg753Gln ασκεί προστατευτική δράση επί της ανάπτυξης της νόσου [267]. Αντίθετα αποτελέσματα προέκυψαν σε μελέτη παιδιών στην Τουρκία. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι μεταξύ αυτών που προσβάλλονταν συχνά από εμπύρετες λοιμώξεις ανευρίσκονταν συχνότερα ετεροζυγώτες ως προς τον πολυμορφισμό Arg753Gln συγκριτικά με τα υγιή παιδιά. Εκτιμήθηκε, μάλιστα, ότι παιδιά ομόζυγα είχαν 6,3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο συχνής ανάπτυξης λοιμώξεων. Κατά συνέπεια, συσχετίστηκε η παρουσία του Arg753Gln με αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων σε παιδιά [268]. Επιπλέον, η παρουσία του συσχετίστηκε με την ανάπτυξη λοίμωξης από κυτταρομεγαλοϊό (CMV) μετά από μεταμόσχευση ήπατος σε χρόνια ηπατίτιδα C, δεδομένου ότι ο ιός αποτελεί συχνό αίτιο λοίμωξης σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Ειδικότερα, διαπιστώθηκε αυξημένο ιικό φορτίο σε ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες ως προς τον πολυμορφισμό συγκριτικά με ομοζυγώτες φορείς του wt γονιδίου, καθώς και μεγαλύτερος κίνδυνος CMV-λοίμωξης στους ομοζυγώτες [269]. Σε συνδυασμό με αυτά, σε ασθενείς με σηπτικό shock, ελέγχθηκε αν η παρουσία του πολυμορφισμού R753Q επηρεάζει την ανοσιακή απάντηση που κινητοποιείται έναντι Gram-θετικών βακτηρίων και *Candida*. Παρατηρήθηκε ότι στις περιπτώσεις που η σήψη οφειλόταν σε *Candida* οι ετεροζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα πλάσματος IFN-γ και IL-8 και υψηλότερα επίπεδα TNF-α συγκριτικά με όσους δεν είχαν τον πολυμορφισμό. Ανάλογη παρατήρηση δεν υπήρξε στις περιπτώσεις των λοιμώξεων από Gram-θετικά βακτήρια. Επομένως συσχετίστηκε η παρουσία του R753Q με τροποποίηση της απάντησης έναντι της *Candida* [270].

Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, δεν προέκυψε συσχέτιση της παρουσίας του πολυμορφισμού R753Q με την ανάπτυξη πνευμονικής ασπεργίλλωσης [244], παρά το ότι πολυμορφισμοί των *TLR1* και *TLR6*, με τους οποίους δημιουργεί συμπλέγματα ο TLR2, έχει δειχθεί πως επηρεάζουν την ανάπτυξη διηθητικής νόσου μετά από αλλογενή μεταμόσχευση πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων [271]. Επιπλέον, εξετάστηκε πιθανή σημασία του στην ανάπτυξη νόσου του Chagas, καθώς αναγνωρίζει και γλυκοϊνοσιτολικά φωσφολιπίδια του *Trypanosoma cruzi*, χωρίς και πάλι να προκύψει συσχέτιση, εξαιτίας αδυναμίας ανίχνευσής του στον πληθυσμό κατοίκων της Κολομβίας που ελέγχθηκε [272]. Το ίδιο αρνητικό αποτέλεσμα

προέκυψε και αναφορικά με τη λοίμωξη από RSV [273] και από *Coxiella burnetii* (πυρετός Q) [185]. Επίσης, ενώ προτείνεται ότι ο TLR2 μεσολαβεί και ανοσιακές απαντήσεις ενάντια στο *H. pylori*, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός του δεν συσχετίστηκε με την ανάπτυξη παθήσεων από το βακτήριο (καρκίνος στομάχου, δωδεκαδακτυλικό έλκος) σε Μεξικανούς, ίσως εξαιτίας της χαμηλής επίπτωσής του μεταξύ αυτών [260]. Επιπρόσθετα, σε παιδιά δεν αποδείχθηκε συσχέτισή του με την προσβολή από το βακτήριο και με την ανάπτυξη δωδεκαδακτυλικού έλκους [258].

Πιθανές συνέπειες της παρουσίας του πολυμορφισμού Arg753Gln αναζητήθηκαν και σε ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα. Πρόκειται για χρόνια φλεγμονώδη δερματική πάθηση που περιλαμβάνεται στο ατοπικό σύνδρομο και σε πολλούς ασθενείς επιπλέκεται με αποικισμό του δέρματος και αυξημένη ευαισθησία σε δερματικές λοιμώξεις προκαλούμενες από *S. aureus*. Σε αυτούς τους ασθενείς η παρουσία του πολυμορφισμού συσχετίστηκε με βαρύτερη κλινική εικόνα της νόσου, με υψηλότερα επίπεδα ολικής IgE και ειδικής έναντι υπεραντιγόνων IgE στον ορό και με αυξημένη ευαισθησία στον αποικισμό από *S. aureus* [274]. Σε συνδυασμό με αυτά, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός συσχετίστηκε με καταστολή της απελευθέρωσης IL-8 από τα μονοκύτταρα ασθενών που φέρουν τη μετάλλαξη μετά από διέγερση με πεπτιδογλυκάνη. Επιπλέον, η έκφραση του TLR2 παρατηρήθηκε πως είναι ελαττωμένη σε ενεργοποιημένα CD4<sup>+</sup> κύτταρα των ασθενών φορέων του πολυμορφισμού, ενώ αποκαθίσταται μετά από διέγερση με λιποτειχοϊκό οξύ. Αντίθετα, το λιποτειχοϊκό οξύ φάνηκε ότι καταστέλλει την έκφραση του υποδοχέα σε μάρτυρες και σε ασθενείς απουσία του πολυμορφισμού. Επομένως, η παρουσία του πολυμορφισμού Arg753Gln συσχετίστηκε με διαταραχή στο επίπεδο της συνεργασίας της φυσικής με την επίκτητη ανοσιακή απάντηση στους ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα [275]. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν συσχετίστηκε με την ανάπτυξη ατοπικού εκζέματος σε μελέτη σε 275 τριάδες γονιών-παιδιού στη Γερμανία [276]. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις προαναφερόμενες μελέτες οι δύο πολυμορφισμοί του *TLR4* που μας απασχολούν στην παρούσα δεν φάνηκε να συσχετίζονται με την ατοπική δερματίτιδα.

Με δεδομένα τα παραπάνω ευρήματα, με την πρόσθετη παρατήρηση της επίτασης της έκφρασης του TLR2 στο ρινικό βλεννογόνο ασθενών με αλλεργική ρινίτιδα [277], αλλά και με βάση την προστατευτική επίδραση που φαίνεται να ασκούν στην εκδήλωση παιδικού άσθματος πολυμορφισμοί των *TLR1* και *TLR6* με τους οποίους ο TLR2 σχηματίζει ετεροδιμερή [278] διερευνήθηκε η σημασία της παρουσίας του R753Q και σε άλλες ατοπικές καταστάσεις. Ωστόσο δεν προέκυψε συσχέτισή του με την εμφάνιση άσθματος σε νεαρούς δανούς αγρότες [279]. Επιπλέον, σε Τυνήσιους, διαπιστώθηκε ότι ο R753Q ανιχνεύεται εξαιρετικά σπάνια και, κατ' επέκταση, δεν συσχετίστηκε με την ευαισθησία στην εκδήλωση παιδικού άσθματος [280].

Παράλληλα, εξετάστηκε πιθανή σημασία της παρουσίας του πολυμορφισμού Arg753Gln στη σαρκοείδωση, με το ίδιο σκεπτικό που εκτέθηκε ήδη όσον αφορά τον TLR4 και με βάση τη σημασία που πιθανολογείται ότι έχουν παθογόνα όπως τα *Propionibacterium acnes* και *M.*

*tuberculosis* στην ανάπτυξη της νόσου, η αναγνώριση των οποίων μεσολαβείται από τον TLR2. Ωστόσο, δεν προέκυψε συσχέτιση της παρουσίας του R753Q με την ευαισθησία των ατόμων στην ανάπτυξη ή με την πορεία της σαρκοείδωσης [281, 282]. Υπήρξαν, όμως, ενδείξεις συσχέτισης του πολυμορφισμού A-16934T του προαγωγέα του *TLR2* με την οξεία/αυτοπεριοριζόμενη σε σχέση με τη χρόνια νόσο, που ενισχύουν την εκτίμηση πιθανού ρόλου του υποδοχέα σε αυτή.

Η χρόνια φλεγμονώδης διεργασία που υπόκειται της αθηρωγένεσης, η πιθανολογούμενη εμπλοκή γενετικών παραγόντων, καθώς και η επιβαρυντική δράση μικροοργανισμών κατέχυνε και την αναζήτηση πιθανού ρόλου του πολυμορφισμού Arg753Gln σε αυτή. Αρχικά διαπιστώθηκε συσχέτισή του με την επανεμφάνιση στένωσης των στεφανιαίων που παρατηρείται σε ορισμένους ασθενείς μετά από αγγειοπλαστική, κάτι που δεν παρατηρήθηκε αναφορικά με τον πολυμορφισμό *TLR4*-Asp299Gly [283]. Ωστόσο, στη συνέχεια δεν συσχετίστηκε η παρουσία του Arg753Gln με την εκδήλωση OEM [284]. Επιπλέον, από μελέτη σε δείγμα 3000 ατόμων δεν προέκυψαν ενδείξεις συσχέτισης του πολυμορφισμού, είτε απευθείας είτε μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους φλεγμονώδεις παράγοντες κινδύνου, με το πάχος έσω-μέσου χιτώνα των καρωτίδων [211]. Επομένως, παραμένει η αδυναμία εξαγωγής οριστικού συμπεράσματος, όπως συμβαίνει και με τον TLR4.

Αναφορικά με την πιθανή σημασία της παρουσίας του πολυμορφισμού Arg753Gln σε αυτοάνοσα νοσήματα, σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα φαίνεται ότι δεν σχετίζεται με την ανάπτυξη ρευματοειδούς αρθρίτιδας και ΣΕΛ [221]. Ωστόσο η πρόσφατη παρατήρηση της αυξημένης έκφρασης του mRNA του TLR2 σε PBMCs ασθενών με ΣΕΛ συντηρούν το ενδιαφέρον για το ρόλο του υποδοχέα και του πολυμορφισμού του στη συγκεκριμένη νόσο [285].

## ***ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

---

## ΥΛΙΚΟ

Τα άτομα που αποτέλεσαν το υλικό της μελέτης (ασθενείς και μάρτυρες) (πίν. 7) προέρχονταν από τα Εξωτερικά Ιατρεία και από τα Προγράμματα Σπιρομετρήσεων με στόχο την έγκαιρη διάγνωση της ΧΑΠ που διοργανώνει η Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας), στον ευρύτερο χώρο της Θεσσαλίας. Η συλλογή του υλικού έγινε μεταξύ Οκτωβρίου 2005 και Οκτωβρίου 2008.

Στη μελέτη συμμετείχαν νυν ή πρώην καπνιστές ηλικίας άνω των 40 ετών, με κατώτερο όριο έκθεσης στο κάπνισμα τα 20 ρys. Ως πρώην καπνιστές ορίστηκαν όσοι είχαν διακόψει το κάπνισμα για διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους. Κριτήριο αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν το ιστορικό άσθματος ή ατοπίας, αυτοάνοσων νοσημάτων, καρκίνου και καταστάσεων συνδεδεμένων με την αθηρομάτωση (ισχαιμική καρδιοπάθεια, υπέρταση, ανευρύσματα κ.ά.).

Όλα τα άτομα που περιλήφθηκαν στη μελέτη υποβλήθηκαν σε διαγνωστικό έλεγχο από ειδικό πνευμονολόγο για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της διάγνωσης της ΧΑΠ, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της GOLD 2007 [286]. Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιήθηκε ξηρό σπιρόμετρο (Koko Legend, Ferraris Louisville, CO, USA) σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της American Thoracic Society (ATS) [287] και καταγράφηκαν τα σπιρομετρικά στοιχεία  $FEV_1$ , FVC, PEF και FEF25-75%. Ως πάσχοντες από ΧΑΠ θεωρήθηκαν τα άτομα με σπιρόμετρηση αποφρακτικού τύπου ( $FEV_1/FVC < 70\%$ ). Ο έλεγχος περιλάμβανε, επίσης, την εξέταση για παρουσία δύσπνοιας, βήχα και απόχρεμψης, καθώς και τη μέτρηση του εκατοστιαίου κορεσμού αιμοσφαιρίνης με οξυγόνο σε αρτηριακό αίμα ( $SatO_2$ ). Η εκτίμηση της βαρύτητας της δύσπνοιας έγινε με βάση την MRC βαθμολόγηση.

Στους πάσχοντες, καθορίστηκε το στάδιο της νόσου με βάση τον  $FEV_1$ . Ως ασθενείς με συχνές παροξύνσεις χαρακτηρίστηκαν όσοι εκδήλωσαν τρεις ή περισσότερες παροξύνσεις της νόσου ανά έτος, για τις οποίες απαιτήθηκε τροποποίηση της φαρμακευτικής αγωγής ή μία παρόξυνση και μία νοσηλεία εξαιτίας της νόσου.

Σε όλα τα άτομα που περιλήφθηκαν στη μελέτη έγινε, από γιατρό της Πνευμονολογικής Κλινικής, σχετική ενημέρωση και συγκατατέθηκαν ενυπογράφως, σύμφωνα με τη Συνθήκη του Helsinki.

Παράλληλα με τις ομάδες των ασθενών και των μαρτύρων εξετάστηκε και αρχειακό γενετικό υλικό 245 ατόμων από το αρχείο του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Στόχος ήταν να υπάρξει σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα των πρωτοαναφερόμενων ομάδων. Αυτό το υλικό χαρακτηρίστηκε ως τυχαίο δείγμα.

**Πίνακας 7:** Χαρακτηριστικά του υπό μελέτη πληθυσμού.

<b>Χαρακτηριστικά</b>	<b>Ασθενείς</b> (n = 134)	<b>Μάρτυρες</b> (n = 106)	<b>Τυχαιο δείγμα</b> (n = 245)
<b>Φύλο</b>			
Άνδρες (n, %)	133 (99,25%)	102 (96,23%)	109 (44,49%)
Γυναίκες (n, %)	1 (0,75%)	4 (3,77%)	136 (55,51%)
<b>Ηλικία</b> (έτη) (μέση τιμή ± SD, εύρος)			
	69,4 ± 8,9, (39-88)	63 ± 9,6, (40-84)	35,5 ± 9,4, (18-65)
<b>Κάπνισμα</b>			
Νυν καπνιστές (n, %)	53 (39,55%)	74 (69,81%)	
Πρώην καπνιστές (n, %)	81 (60,45%)	32 (30,19%)	
<b>pys</b>			
	70,9 ± 37,8	54,8 ± 23,3	
<b>Στάδιο ΧΑΠ</b>			
Ήπια (FEV <sub>1</sub> ≥80%) (n, %)	6 (4,48%)		
Μέτρια(FEV <sub>1</sub> 50-79%) (n, %)	74 (55,22%)		
Σοβαρή(FEV <sub>1</sub> 30-49%) (n, %)	40 (29,85%)		
Πολύ σοβαρή(FEV <sub>1</sub> <30%) (n, %)	14 (10,45%)		
<b>Συχνότητα παροξύνσεων</b> (n = 123)			
Συχνές παροξύνσεις (n, %)	34 (27,64%)		
Όχι συχνές παροξύνσεις (n, %)	89 (72,36%)		

## ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA έγινε από περιφερικό αίμα, εντός 2 ωρών από την αιμοληψία σε σωληνάρια EDTA, με τη χρήση του QiAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Cat.No. 51104) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Κάθε δείγμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου (15-25 °C). Αρχικά, σε σωληνάριο φυγοκέντρωσης των 1,5 mL τοποθετήθηκαν 20 µL πρωτεάσης<sup>1</sup> (Qiagen). Στη συνέχεια, στην πρωτεάση προστέθηκαν 200 µL αίματος και 200 µL του διαλύματος λύσης (Buffer AL), το οποίο παρέχεται από τον κατασκευαστή. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση του μείγματος σε υδατόλουτρο 56°C για 20 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 µL απόλυτης αιθανόλης (96-100%), το μείγμα εναποτέθηκε σε ειδική στήλη (QiAamp Spin Column) και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 8000 rpm για 1 min και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρωσης. Πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές πλύσεις<sup>2</sup> της στήλης με τα διαλύματα AW1 και AW2, που ακολουθήθηκαν από φυγοκέντρωση στις 8000 rpm για 1 min και 14000 rpm για 3 min, αντίστοιχα. Τέλος, προστέθηκαν σε κάθε στήλη 80 µL διαλύματος AE, ακολούθησε επώαση για 1 min και τελική φυγοκέντρωση στις 8000 rpm για 1 min. Το προϊόν της τελευταίας φυγοκέντρωσης περιείχε απομονωμένο DNA σε συγκέντρωση 50-200 ng/ µL (ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης έγινε με φωτομέτρηση). Τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν, αποθηκεύτηκαν πριν από τη χρήση τους στους -80°C.

### 2. Ανίχνευση των πολυμορφισμών *Asp299Gly* και *Thr399Ile* του *TLR4*

#### 2.1. PCR

Η ανίχνευση των πολυμορφισμών *TLR4*-D299G και *TLR4*-T399I, έγινε με allele specific-PCR (AS-PCR) ακολουθούμενη από RFLP ανάλυση, όπως περιγράφεται από τους Lorenz et al [288]. Με τη συγκεκριμένη τεχνική γίνεται αρχικά ενίσχυση PCR τμήματος DNA που περιέχει τον κάθε πολυμορφισμό και ακολουθεί πέψη του προϊόντος με ειδικό ένζυμο περιορισμού. Ωστόσο, η αλληλουχία του DNA στη θέση όπου εμφανίζονται και οι δύο πολυμορφισμοί του *TLR4* που μελετήθηκαν, τόσο επί παρουσίας όσο και επί απουσίας μετάλλαξης, δεν περιλαμβάνει φυσιολογικά θέσεις πέψης με ένζυμο περιορισμού. Κατά συνέπεια, έγινε ειδικός σχεδιασμός και τροποποίηση των πρόσθιων εκκινητών στο 3' άκρο τους, με στόχο τη δημιουργία αλληλουχίας πέψης από το αντίστοιχο, για κάθε SNP, ένζυμο περιορισμού. Η συ-

<sup>1</sup> Πρόκειται για ένζυμο με το οποίο επιτυγχάνεται η απομάκρυνση κυτταρικών και ιστονικών πρωτεϊνών που είναι προσδεδεμένες στο DNA, μέσω της πέψης πεπτιδικών δεσμών στο καρβοξυτελικό τμήμα αλκυλικών, αρωματικών και υδροφοβικών αμινοξέων.

<sup>2</sup> Τα διαλύματα πλύσης, μέσω των αλάτων που περιέχουν και του pH τους, βελτιώνουν την ποιότητα του εξαγόμενου DNA, καθώς διασφαλίζουν την απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων υλικών που είναι πιθανόν να παρεμποδίσουν την PCR και άλλες ενζυμικές αντιδράσεις.

γκεκριμένη τροποποίηση δεν εμποδίζει τη σύνδεση του εκκινητή στην αλληλουχία του DNA, δεδομένου ότι δεν αφορά την τελευταία βάση του.

Ειδικότερα, για την ανίχνευση του *TLR4*-D299G πολυμορφισμού, στον πρόσθιο εκκινητή 299S (5'-3') GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCG(C)ATG η υπογραμμισμένη γουανίνη (G) στο 3' άκρο του έχει αντικατασταθεί από μία κυτοσίνη που φαίνεται στην παρένθεση. Σε περίπτωση που το δείγμα φέρει τον πολυμορφισμό, δημιουργείται αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιορισμού *NcoI* (Invitrogen, Cat.No. 15421-019). Για την ανίχνευση του *TLR4*-T399I πολυμορφισμού, στον πρόσθιο εκκινητή 399F (5'-3') GGTGCTGCTCTCAAAGTGATTTTGGGAG(C)AA, η υπογραμμισμένη κυτοσίνη (C) στο 3' άκρο του έχει αντικατασταθεί από μία γουανίνη που φαίνεται στην παρένθεση. Παρόμοια, εφόσον το δείγμα είναι θετικό για τον πολυμορφισμό, δημιουργείται αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιορισμού *HinfI* (Invitrogen, Cat.No.15223-019). Στον πίνακα 8 φαίνονται οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

**Πίνακας 8:** Αλληλουχίες εκκινητών και συνθήκες PCR για την ανίχνευση των D299G και T399I του *TLR4*.

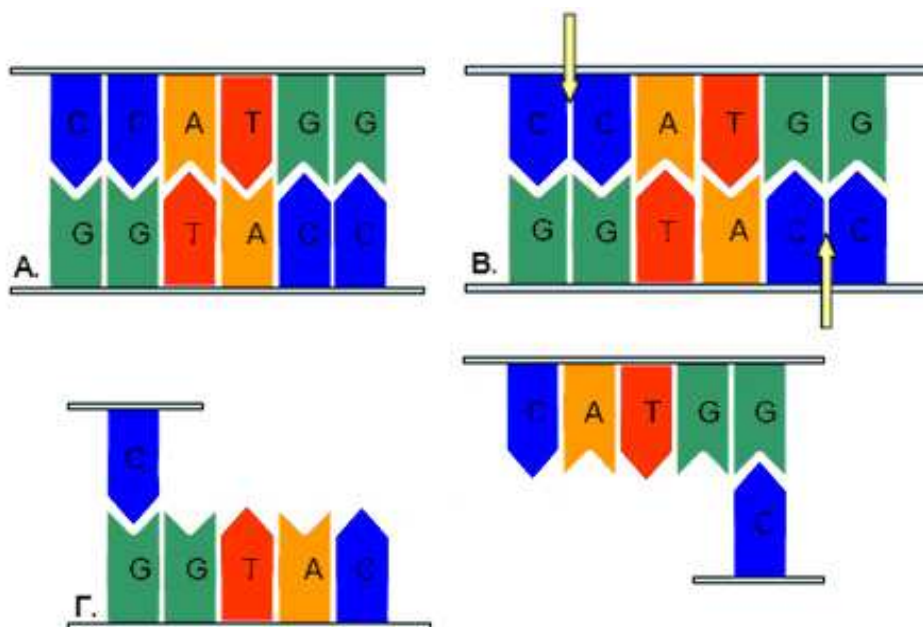
SNP	Εκκινητής	Αλληλουχία των εκκινητών (5'-3')	Αριθμός βάσεων	Θερμοκρασία υβριδισμού PCR	Προϊόν PCR (bp)
<b>TLR4-D299G</b>	299S	GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG	30	55 °C	249
	299AS	GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC	27		
<b>TLR4-T399I</b>	399F	GGTGTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA	31	55 °C	406
	399R	ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT	30		

Για κάθε αντίδραση PCR, ο όγκος του μείγματος ήταν 30  $\mu$ L και περιείχε το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 0,01% ζελατίνη) (Invitrogen, Cat.No. 10297-018), 1,5 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M από κάθε τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTP) (Invitrogen, Cat No.10297-018), 20 pmoles από κάθε εκκινητή, 1,0 U Taq-πολυμεράση (Invitrogen, Cat No. 18038-042) και 100-200 ng DNA. Η αντίδραση PCR και για τους δύο πολυμορφισμούς διεξαγόταν σε 30 κύκλους, μετά από αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94 °C για 2 min. Κάθε κύκλος περιελάμβανε αποδιάταξη στους 94 °C για 30 sec, υβριδισμό των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στους 55 °C για 30 sec και σύνθεση-επέκταση νέων αλυσών DNA με τη δράση της Taq-πολυμεράσης στους 72 °C για 30 sec. Η τελική φάση επέκτασης, μετά την ολοκλήρωση των 30 κύκλων, διαρκούσε 5 min στους 72 °C. Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Peltier Thermol Cycle PTC-200 (Massachusetts, USA). Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Επιπλέον, σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβανόταν ένα σωληνάριο-μάρτυρας χωρίς γενετικό υλικό, έτσι ώστε να ελέγχεται η καθαρότητα των αντιδραστηρίων.



## 2.2. Πέψη των προϊόντων PCR με χρήση ενζύμων περιορισμού

Για την ανίχνευση του *TLR4*-D299G πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού *NcoI*, το οποίο απομονώνεται από τον μικροοργανισμό *Nocardia coralline*. Για την πέψη 6  $\mu$ L του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 2,5 U του ενζύμου *NcoI*, παρουσία του ρυθμιστικού του διαλύματος, 10x buffer Tango (Fermentas, Cat No. ER0571). Το ένζυμο αναγνωρίζει συγκεκριμένη αλληλουχία σε δίκλωνο DNA, την οποία και διασπά (εικ. 6).



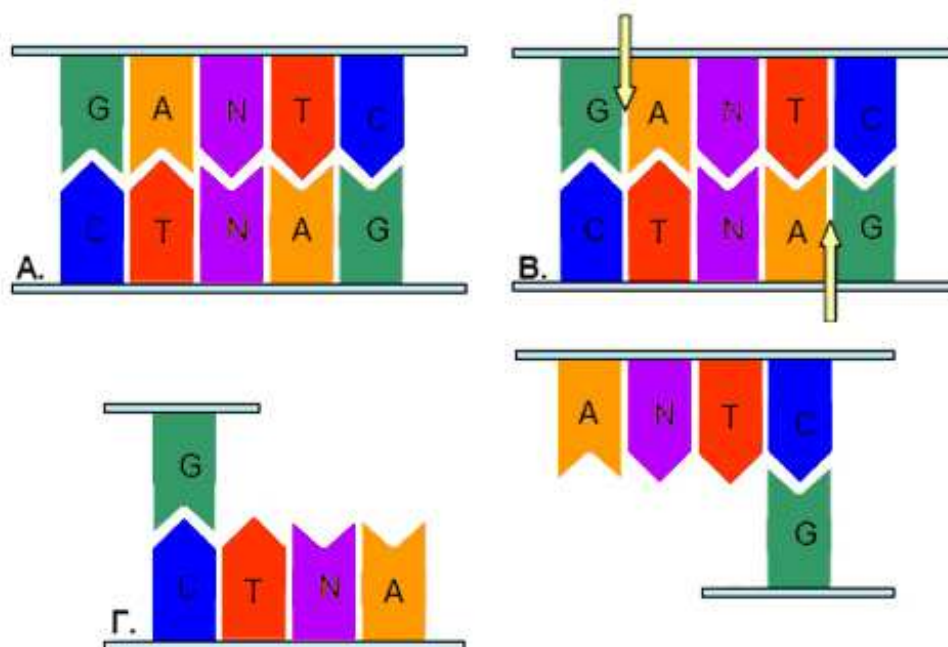
**Εικόνα 6:** Η αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ένζυμο *NcoI* και η θέση πέψης (βέλη). A: αδενίνη T: θυμίνη G: γουανίνη C: κυτοσίνη.

Αναλυτικά, μετά την ηλεκτροφόρηση, επί απουσίας του *TLR4*-D299G πολυμορφισμού δεν παρατηρείται πέψη των προϊόντων PCR, οπότε ανιχνεύεται μόνο μία δέσμη προϊόντος στα 249 bp που αντιστοιχεί στο wt αλληλόμορφο. Σε ετεροζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού ανιχνεύονται τρεις δέσμες, μία στα 249 bp και άλλες δύο, που αντιστοιχούν στα προϊόντα πέψης του πολυμορφικού αλληλίου, στα 218 bp και 26 bp. Η τελευταία δέσμη δεν γίνεται ορατή σε συνήθεις πηκτές αγαρόζης, αλλά μόνο σε πηκτές ακρυλαμίδης. Τέλος, σε ομοζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού ανιχνεύονται μόνο οι δέσμες των 218 bp και 26bp, ενώ σε πηκτική αγαρόζη είναι ορατή μόνο η δέσμη των 218bp.

Για την ανίχνευση του πολυμορφισμού *TLR4*-T399I χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού *HinfI* (Invitrogen, Cat No. 15223-019), το οποίο απομονώνεται από το μικροοργανισμό *Haemophilus influenzae* R<sub>f</sub>. Για την πέψη 6  $\mu$ L του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 2,5 U του ενζύμου *HinfI*, παρουσία του ρυθμιστικού του διαλύματος, RE<sub>ACT</sub><sup>®</sup> 2. Το ένζυμο αναγνωρίζει συγκεκριμένη αλληλουχία σε δίκλωνο DNA, την οποία και διασπά (εικ. 7).

Αναλυτικά, μετά την ηλεκτροφόρηση, επί απουσίας του *TLR4*-T399I πολυμορφισμού δεν παρατηρείται πέψη των προϊόντων PCR, οπότε ανιχνεύεται μόνο μία δέσμη προϊόντος στα

407 bp που αντιστοιχεί στο wt αλληλόμορφο. Σε ετεροζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού ανιχνεύονται τρεις δέσμες, μια στα 407 bp και άλλες δύο, που αντιστοιχούν στα προϊόντα πέψης του πολυμορφικού αλληλίου, στα 375 bp και στα 29 bp. Η τελευταία δέσμη δεν γίνεται ορατή σε συνήθεις πηκτές αγαρόζης, αλλά μόνο σε πηκτές ακρυλαμίδης. Τέλος, σε ομοζυγώτες φορείς ανιχνεύονται μόνο οι δέσμες των 375 bp και 29bp, ενώ σε πηκτική αγαρόζη είναι ορατή μόνο η δέσμη των 375 bp.



Εικόνα 7: Η αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ενζύμου *HinfI* και η θέση πέψης (βέλη). A: αδενίνη T: θυμίνη G: γουανίνη C: κυτοσίνη N: οποιαδήποτε βάση.

Οι αντιδράσεις πέψης έγιναν σε υδατόλουτρο (M20, LAUDA) ή στον αυτόματο κυκλικό μετατροπέα θερμοκρασίας Peltier Thermol Cycle PTC-200 (Massachusetts, USA), στους 37 °C για 2 ώρες. Σε κάθε αντίδραση πέψης συμπεριλαμβανόταν και ένας θετικός, ως προς την παρουσία του πολυμορφισμού, μάρτυρας με σκοπό τον έλεγχο της σωστής λειτουργίας του ενζύμου. Ανάλυση των προϊόντων PCR γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% [Ultra Pure Agarose (Invitrogen, Cat.No.15510-027) + 1X TBE (BioRad, Cat No. 161-0770)] βαμμένη με βρωμιούχο αιθύδιο (BioRad, Cat No. 15585-011), όπου τα δείγματα “έτρεχαν” για 60 min στα 120 V. Χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακών βαρών E-Gel® Low Range Quantitative DNA Ladder (100-2000 bp) (Invitrogen, Cat.No.12373-031). Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, Serial No. M031308).

Η συνολική πειραματική διαδικασία, AS-PCR και RFLP ανάλυση, επαναλήφθηκε τυφλά για 40 ασθενείς, με σκοπό την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

### 3. Ανίχνευση του πολυμορφισμού *TLR2-R753Q*

#### 3.1. PCR-RFLP

Η ανίχνευση του πολυμορφισμού *TLR2-R753Q* έγινε σε 87 από τα άτομα της μελέτης με πρωτόκολλο PCR-RFLP και στα υπόλοιπα 153 με πρωτόκολλο allele specific-PCR (AS-PCR).

Συγκεκριμένα, το πρωτόκολλο PCR-RFLP σχεδιάστηκε σύμφωνα με τους Schröder et al [289]. Βασίζεται στο γεγονός ότι αποτέλεσμα του πολυμορφισμού *TLR2-R753Q* είναι η δημιουργία μιας αλληλουχίας που αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιορισμού *SfcI*, η οποία φαίνεται στην εικόνα 8. Επομένως, σχεδιάστηκαν εκκινητές που ενισχύουν μια περιοχή 430 bp, οι οποίοι φαίνονται στον πίνακα 9.

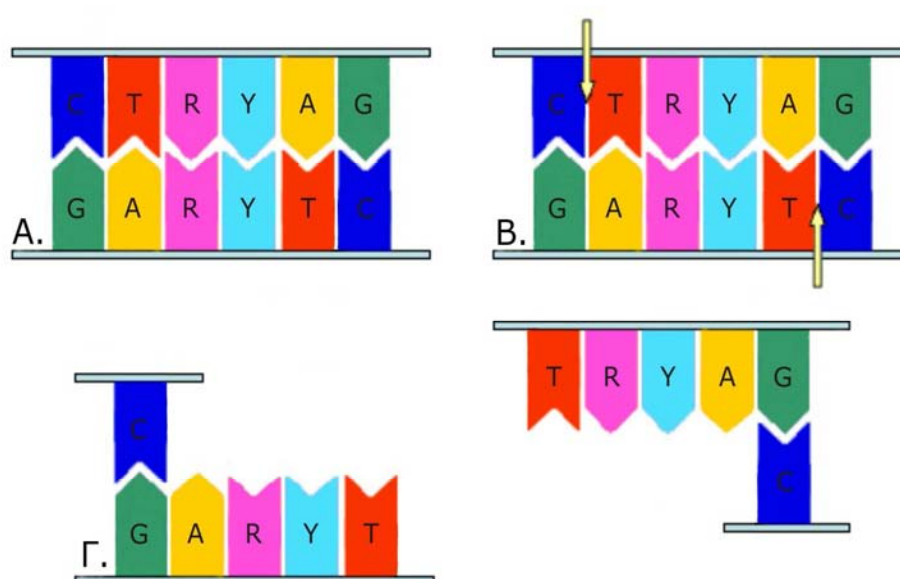
**Πίνακας 9:** Αλληλουχίες εκκινητών και συνθήκες της PCR-RFLP για την ανίχνευση του *TLR2-R753Q*.

SNP	Εκκινητής	Αλληλουχία των εκκινητών (5'-3')	Αριθμός βάσεων	Θερμοκρασία υβριδισμού PCR	Προϊόν PCR (bp)
<b><i>TLR2-R753Q</i></b>	753F	TATGGTCCAGGAGCTGGAGA	20	65 °C	430
	753R	TGACATAAAGATCCCAACTAGACAA	25		

Για κάθε αντίδραση PCR, ο όγκος του μείγματος ήταν 30  $\mu$ L και περιείχε το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,01% ζελατίνη) (Invitrogen, Cat.No. 10297-018), 1,5 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M από κάθε τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTP) (Invitrogen, Cat No.10297-018), 20 pmoles από κάθε εκκινητή, 1,0 U Taq-πολυμεράση (Invitrogen, Cat No. 18038-042) και 100-200 ng DNA. Η αντίδραση PCR διεξαγόταν σε 34 κύκλους, μετά από αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94 °C για 2 min. Κάθε κύκλος περιελάμβανε αποδιάταξη στους 94 °C για 30 sec, υβριδισμό των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στους 64 °C για 30 sec και σύνθεση-επέκταση νέων αλυσών DNA με τη δράση της Taq-πολυμεράσης στους 72 °C για 45 sec. Η τελική φάση επέκτασης, μετά την ολοκλήρωση των 34 κύκλων, διαρκούσε 5 min στους 72 °C. Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Peltier Thermol Cycle PTC-200 (Massachusetts, USA). Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Επιπλέον, σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβανόταν ένα σωληνάριο-μάρτυρας χωρίς γενετικό υλικό, προκειμένου να ελέγχεται η καθαρότητα των αντιδραστηρίων.

Για την πέψη 6  $\mu$ L του προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 0,15 U του ενζύμου *SfcI*, παρουσία των ρυθμιστικών του διαλυμάτων 10xBSA και NEbuffer 4 (New England BioLabs,

Cat No. R0561L). Το συγκεκριμένο ένζυμο απομονώνεται από ένα στέλεχος *E. Coli* που φέρει το *SfcI* γονίδιο από τον *Streptococcus faecium* (εικ. 8). Όπως είναι αναμενόμενο, στους ασθενείς που έχουν μόνο wt αλληλία δεν παρατηρείται πέψη των προϊόντων PCR. Αντίθετα, επί παρουσίας του SNP πραγματοποιείται πέψη του πολυμορφικού αλληλίου και εμφάνιση δύο επιπρόσθετων δεσμών κατά την ηλεκτροφόρηση. Ανάλυση των προϊόντων PCR-RFLP γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% [Ultra Pure Agarose (Invitrogen, Cat.No.15510-027) + 1x TBE (BioRad, Cat no. 161-0770)] βαμμένη με βρωμιούχο αιθύδιο (BioRad, Cat no. 15585-011), όπου τα δείγματα “έτρεχαν” για 60 min στα 120 V. Χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακών βαρών E-Gel® Low Range Quantitative DNA Ladder (100-2000 bp) (Invitrogen, Cat.No.12373-031). Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, Serial No M031308).



**Εικόνα 8:** Η αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το ένζυμο *SfcI* και η θέση πέψης (βέλη). Α: αδενίνη Τ: θυμίνη G: γουανίνη C: κυτοσίνη R: πουρίνη Y: πυριμιδίνη.

Τελικά, μετά την ηλεκτροφόρηση, επί απουσίας του πολυμορφισμού ανιχνεύεται μόνο μία δέσμη προϊόντος PCR στα 430 bp που αντιστοιχεί στο wt αλληλόμορφο. Σε ετεροζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού ανιχνεύονται τρεις δέσμες, μία στα 430 bp και άλλες δύο στα 307 bp και στα 123 bp που αντιστοιχούν στα προϊόντα πέψης του πολυμορφικού αλληλίου. Τέλος, σε ομοζυγώτες φορείς ανιχνεύονται μόνο οι δέσμες των 307 και 123 bp.

Η συνολική πειραματική διαδικασία PCR-RFLP, επαναλήφθηκε τυφλά για 20 ασθενείς, με σκοπό την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

### 3.2. Allele Specific-PCR

Το πρωτόκολλο AS-PCR σχεδιάστηκε σύμφωνα με τη μελέτη των Ogus et al [264]. Με την τεχνική αυτή, για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο αντιδράσεις PCR σε καθεμία από

τις οποίες χρησιμοποιούνται τρεις εκκινητές. Οι δύο εξωτερικοί (F και R) ενισχύουν ένα μεγαλύτερο τμήμα DNA που περιλαμβάνει τη θέση του υπό εξέταση πολυμορφισμού και είναι κοινοί και στις δύο αντιδράσεις PCR. Ο τρίτος εκκινητής (G ή A) διαφέρει μεταξύ των δύο αντιδράσεων PCR κατά την τελευταία βάση του στο 3' άκρο και ενισχύει, με τον F εκκινητή, ένα μικρότερο τμήμα DNA, το οποίο σταματά ακριβώς στη θέση του πολυμορφισμού. Η διαφορά της τελευταίας βάσης επιτρέπει την ενίσχυση τμήματος DNA, μόνο εφόσον υπάρχει απόλυτη συμπληρωματικότητα προς τον εκάστοτε εκκινητή. Έτσι, εφόσον δεν υπάρχει πολυμορφισμός ο εκκινητής που αντιστοιχεί στο wt αλληλίο (G) αναγνωρίζει συμπληρωματική αλληλουχία στο αποδιατεταγμένο DNA και δημιουργεί προϊόν. Αντίστοιχα, εφόσον υπάρχει πολυμορφισμός, ο εκκινητής για το μεταλλαγμένο αλληλίο (A) θα δώσει προϊόν. Οι αλληλουχίες των εκκινητών φαίνονται στον πίνακα 10.

**Πίνακας 10:** Αλληλουχίες εκκινητών και συνθήκες της AS-PCR για την ανίχνευση του *TLR2-R753Q*

SNP	Εκκινητής	Αλληλουχία των εκκινητών (5'-3')	Αριθμός βάσεων	Θερμοκρασία υβριδισμού PCR	Προϊόν PCR (bp)
<b>TLR2- R753Q</b>	F	TATGGTCCAGGAGCTGGAGA	20	65 °C	(F-R)
	R	TGACATAAAGATCCCAACTAGACAA	25		430
	G	GGTCTTGGTGTTCATTATCTTCC	23		(F-G) 307
	A	GGTCTTGGTGTTCATTATCTTCT	23		(F-A) 307

Για κάθε αντίδραση PCR, ο όγκος του μείγματος ήταν 30  $\mu$ L και περιείχε το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,01% ζελατίνη) (Invitrogen, Cat.No. 10297-018), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M από κάθε τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTP) (Invitrogen, Cat No.10297-018), 20 pmoles για καθένα από τους εκκινητές F και R, 10 pmoles για καθένα από τους εκκινητές G και A, 1,0 U Taq Polymerase (Invitrogen, Cat No. 18038-042) και 100-200 ng DNA. Η αντίδραση PCR διεξαγόταν σε 33 κύκλους, μετά από αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94 °C για 2 min. Κάθε κύκλος περιελάμβανε αποδιάταξη στους 94 °C για 30 sec, υβριδισμό των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στους 65 °C για 30 sec και σύνθεση-επέκταση νέων αλύσεων DNA με τη δράση της Taq-πολυμεράσης στους 72 °C για 45 sec. Η τελική φάση επέκτασης, μετά την ολοκλήρωση των 33 κύκλων, διαρκούσε 5 min στους 72 °C. Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Peltier Thermol Cycle PTC-200 (Massachusetts, USA). Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν όλες οι οδηγίες για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Επιπλέον, σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβανόταν ένα σωληνάριο-μάρτυρας χωρίς γενετικό υλικό, προκειμένου να ελέγχεται η καθαρότητα των αντιδραστηρίων. Ανάλυση των προϊόντων PCR γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% [Ultra

Pure Agarose (Invitrogen, Cat.No.15510-027) + 1x TBE (BioRad, Cat No. 161-0770)] βαμμένα με βρωμιούχο αιθύδιο (BioRad, Cat No. 15585-011), όπου τα δείγματα "έτρεχαν" για 60 min στα 120 V. Χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακών βαρών E-Gel® Low Range Quantitative DNA Ladder (100-2000 bp) (Invitrogen, Cat.No.12373-031). Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, Serial No. M031308).

Αναλυτικά, επί απουσίας του πολυμορφισμού, ανιχνεύονται δύο δέσμες προϊόντων PCR στα 430 και 307 bp μετά την ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος (προϊόν G) που προκύπτει για το εκάστοτε δείγμα με την προσθήκη των F, R και G εκκινητών. Αντίθετα, ανιχνεύεται μία δέσμη στα 430 bp μετά την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος που προκύπτει με την προσθήκη των F, R και A εκκινητών (προϊόν A), δεδομένου ότι ο εκκινητής A δεν συνδέεται στο αποδιατεταγμένο DNA και δεν δίνει προϊόν. Σε ετεροζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού ανιχνεύονται δύο δέσμες στα 430 και 307 bp μετά την ηλεκτροφόρηση τόσο του G όσο και του A προϊόντος, καθώς όλοι οι εκκινητές μπορούν να συνδεθούν σε συμπληρωματική αλληλουχία. Τέλος, σε ομοζυγώτες φορείς ανιχνεύονται δύο δέσμες προϊόντων PCR στα 430 bp και 307 bp μετά την ηλεκτροφόρηση του A προϊόντος και μία δέσμη μετά την ηλεκτροφόρηση του G προϊόντος στα 430 bp, καθώς ο εκκινητής G δεν αναγνωρίζει απόλυτα συμπληρωματική αλληλουχία και δεν συνδέεται.

Η συνολική πειραματική διαδικασία, AS-PCR, επαναλήφθηκε τυφλά για 35 ασθενείς, με σκοπό την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

#### 4. Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, αναφορικά με την παρουσία των πολυμορφισμών *TLR4-D299G*, *TLR4-T399I* και *TLR2-R753Q* έγινε ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing) των καθαρισμένων PCR προϊόντων. Χρησιμοποιήθηκαν τυχαία επιλεγμένα δείγματα, τόσο θετικά, ως προς την παρουσία των πολυμορφισμών, όσο και αρνητικά. Πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη αλληλούχηση με τη χρήση του Big Dye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems) και του γενετικού αναλυτή αλληλουχίας βάσεων ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του QIAquick Purification kit (Qiagen, Cat.No. 28104), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αποσκοπούσε στην απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, πολυμεράσης και αλάτων, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για ανάλυση αλληλουχίας βάσεων. Αρχικά, στο προϊόν PCR που προοριζόταν για καθαρισμό, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα (PBI buffer). Στη συνέχεια, το μείγμα τοποθετήθηκε σε ειδική στήλη (QIAquick column) που παρέχεται από τον κατασκευαστή. Στη μεμβράνη της συγκεκριμένης στήλης γίνεται προσρόφηση του DNA μέσω του διαλύματος PBI, το οποίο εξασφαλίζει την απαιτούμενη συγκέντρωση αλάτων και pH. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 10000 g για 1 min και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πλύση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα

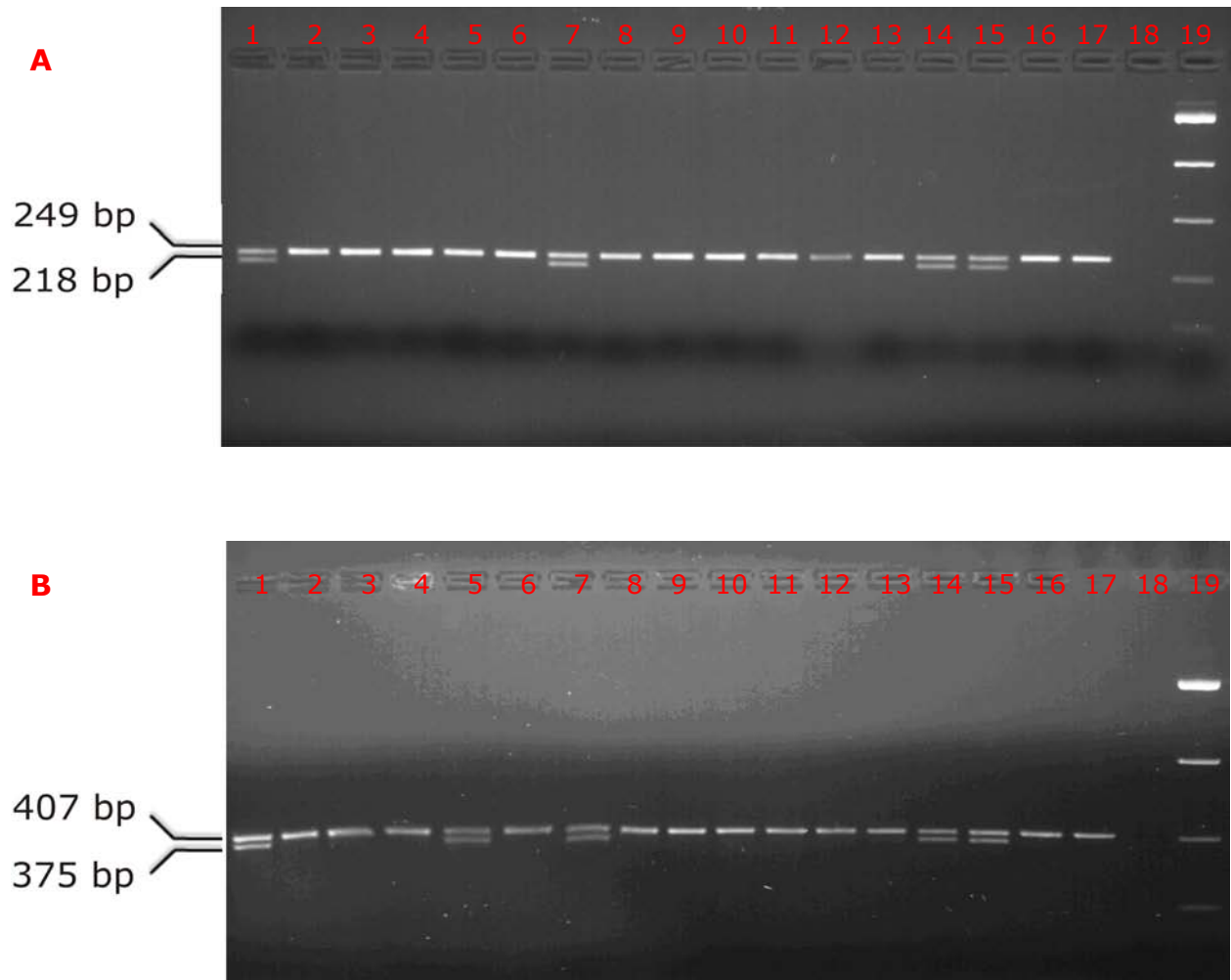
που περιέχει αιθανόλη (PE buffer) και φυγοκέντρωση στα 10000 g για 1 min. Ακολούθησε τρίτη φυγοκέντρωση υπό τις ίδιες συνθήκες χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος. Τέλος, η στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάριο φυγοκέντρωσης των 1,5 mL, προστέθηκαν 35 µL διαλύματος εκχύλισης (EB buffer), παρέμεινε για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιήθηκε τελική φυγοκέντρωση στα 10000 g για 1 min. Το καθαρισμένο δείγμα DNA αποθηκεύτηκε προσωρινά στους -20 °C έως ότου χρησιμοποιηθεί για αλληλούχηση.

## *5. Στατιστική ανάλυση*

Η  $\chi^2$  ανάλυση με τη διόρθωση κατά Yates χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να συγκριθούν οι συχνότητες των αλληλίων μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Όπου χρειάστηκε υπολογίστηκε ο ακριβής έλεγχος Fisher. Η αναζήτηση συσχέτισης ανάμεσα στη ΧΑΠ και την παρουσία των τριών πολυμορφισμών που εξετάστηκαν έγινε με τη χρήση της μονοπαραγοντικής λογιστικής παλινδρόμησης. Κατά τον ίδιο τρόπο διερευνήθηκε η ύπαρξη συσχετίσεων της παρουσίας των πολυμορφισμών και με άλλες μεταβλητές. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως λόγος αναλογιών (odds ratio, OR) με το αντίστοιχο διάστημα εμπιστοσύνης 95% (confidence interval, CI). Σημαντική θεωρήθηκε μια απόκλιση όταν  $p < 0.05$ . Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμασία  $U$  των Mann-Whitney, προκειμένου να συγκριθούν οι συνεχείς μεταβλητές. Τέλος, αναζητήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της 10<sup>ης</sup> έκδοσης του Στατιστικού Πακέτου για τις Κοινωνικές Επιστήμες (Statistical Package for the Social Sciences 10, SPSS 10, Chicago, IL, USA).

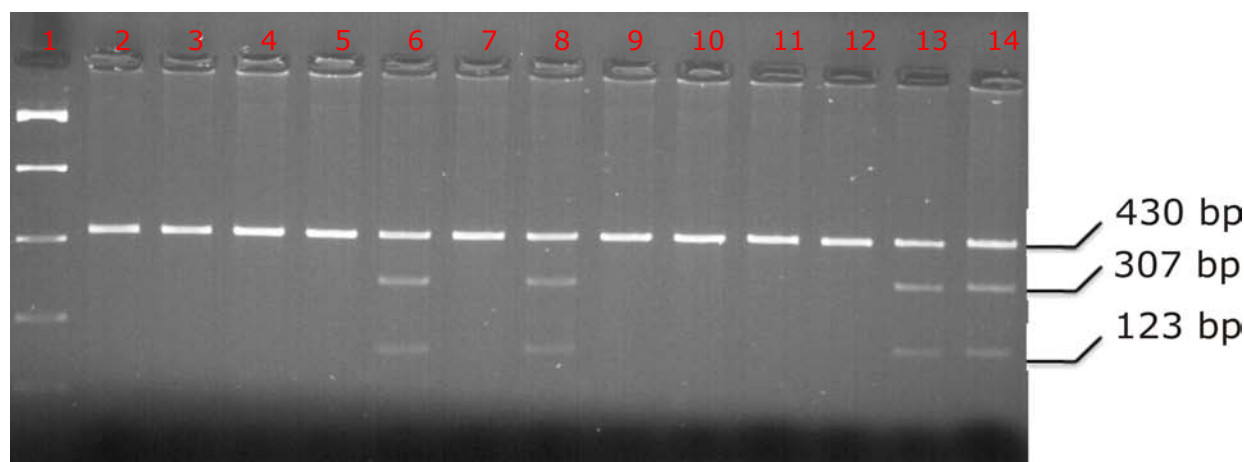
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην Εικόνα 9 παρουσιάζονται ενδεικτικά παραδείγματα πειραμάτων για την ανίχνευση των πολυμορφισμών του *TLR4* και στις Εικόνες 10-11 αντίστοιχα για τον πολυμορφισμό του *TLR2*.

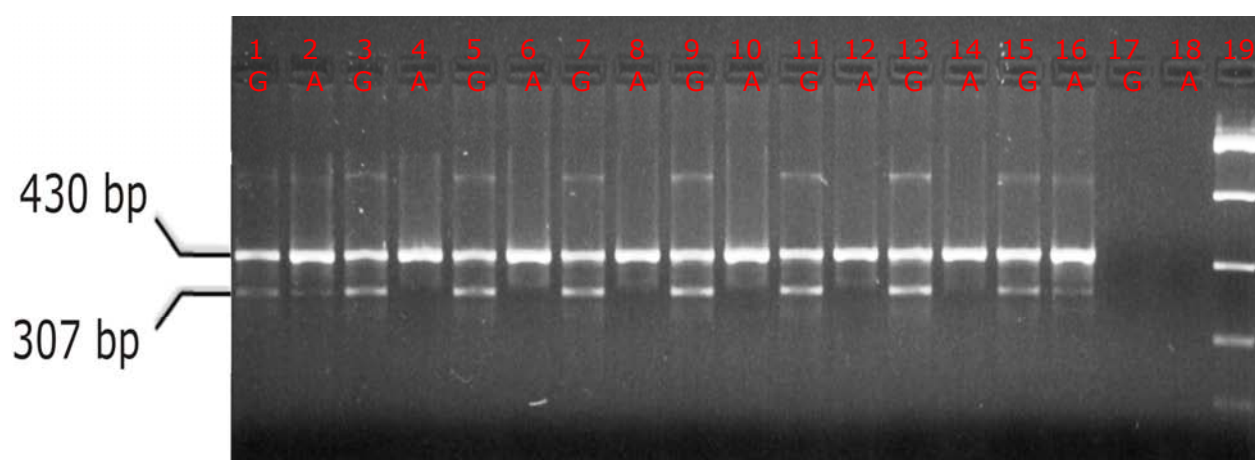


**Εικόνα 9:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης μετά από PCR-RFLP για την ανίχνευση των *TLR4*-Asp299Gly και *TLR4*-Thr399Ile πολυμορφισμών. Η στήλη 1 αντιστοιχεί στο δείγμα θετικού μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα. Οι στήλες 2-17 αντιστοιχούν στους ίδιους ασθενείς με ΧΑΠ. Η στήλη 18 αντιστοιχεί στο δείγμα χωρίς γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση για τον έλεγχο της αποφυγής επιμόλυνσης. Η στήλη 19 αντιστοιχεί στο μάρτυρα μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα (100-2000 bp). **A:** Τα δείγματα 2-6, 8-13 και 16-17 δεν φέρουν πολυμορφισμό και δίνουν άπεπτα προϊόντα στα 249 bp. Τα δείγματα 7, 14 και 15, που είναι ετερόζυγα ως προς τον Asp299Gly, δίνουν προϊόντα στα 249 bp και, μετά από πέψη, στα 218 bp. **B:** Τα δείγματα 2-4, 6, 8-13 και 16-17 δεν φέρουν πολυμορφισμό και δίνουν άπεπτα προϊόντα στα 407 bp. Τα δείγματα 5, 7, 14 και 15 που είναι ετερόζυγα ως προς τον Thr399Ile δίνουν προϊόντα στα 407 bp και, μετά από πέψη, στα 375 bp. Ο ασθενής που αντιστοιχεί στο δείγμα της στήλης 5 είναι ετεροζυγώτης μόνο ως προς τον Thr399Ile πολυμορφισμό.





**Εικόνα 10:** Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης μετά από PCR-RFLP για την ανίχνευση του TLR2-Arg753Gln πολυμορφισμού. Η στήλη 1 αντιστοιχεί στο μάρτυρα μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα (100-2000 bp). Οι στήλες 2-13 αντιστοιχούν σε καπνιστές. Η στήλη 14 αντιστοιχεί στο δείγμα θετικού μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα. Τα δείγματα 2-5, 7 και 9-12 δεν φέρουν πολυμορφισμό και δίνουν άπεπτα προϊόντα στα 430 bp. Τα δείγματα 6, 8 και 13, που είναι ετερόζυγα ως προς τον Arg753Gln, δίνουν προϊόντα στα 430 bp και, μετά από πέψη, στα 307 bp και 123 bp.



**Εικόνα 11:** Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης μετά από AS-PCR για την ανίχνευση του TLR2-Arg753Gln πολυμορφισμού. Οι στήλες 1-2 αντιστοιχούν στο δείγμα θετικού μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα. Οι στήλες 3-16 αντιστοιχούν σε καπνιστές και, μάλιστα, ανά ζεύγος G/A αντιστοιχούν στο ίδιο άτομο. Οι στήλες 17-18 αντιστοιχούν στο δείγμα χωρίς γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση για τον έλεγχο της αποφυγής επιμόλυνσης. Η στήλη 19 αντιστοιχεί στο μάρτυρα μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα (100-2000 bp). Τα δείγματα 3-14, που αντιστοιχούν σε 6 καπνιστές, δεν φέρουν πολυμορφισμό και δίνουν προϊόντα μόνο στο G. Το δείγμα που αντιστοιχεί στις στήλες 15-16 είναι ετερόζυγο ως προς τον Arg753Gln και δίνει προϊόντα και στο G και στο A.

**Πίνακας 11:** Αποτελέσματα για τον *TLR4-Asp299Gly* πολυμορφισμό. Επίπτωση γονοτύπων και συχνότητες 299Gly αλληλίου.

	n	AA (%)	AG (%)	GG (%)	Συχνότητα πολυμορφικού αλληλίου %
Ασθενείς	134	113 (84,33)	21 (15,67)	0	<b>7,8</b>
Μάρτυρες	106	97 (91,51)	9 (8,49)	0	<b>4,2</b>
Τυχαίο δείγμα	245	215 (87,76)	29 (11,84)	1 (0,4)	<b>6,3</b>

**Πίνακας 12:** Αποτελέσματα για τον *TLR4-Thr399Ile* πολυμορφισμό. Επίπτωση γονοτύπων και συχνότητες 399Ile αλληλίου.

	n	CC (%)	CT (%)	TT (%)	Συχνότητα πολυμορφικού αλληλίου %
Ασθενείς	134	112 (83,58)	22 (16,42)	0	<b>8,2</b>
Μάρτυρες	106	98 (92,45)	8 (7,55)	0	<b>3,7</b>
Τυχαίο δείγμα	245	216 (88,16)	27 (11,02)	2 (0,82)	<b>6,3</b>

**Πίνακας 13:** Αποτελέσματα για τον *TLR2-Arg753Gln* πολυμορφισμό. Επίπτωση γονοτύπων και συχνότητες 753Gln αλληλίου.

	n	GG (%)	GA (%)	AA (%)	Συχνότητα πολυμορφικού αλληλίου %
Ασθενείς	134	129 (96,27)	5 (3,73)	0	<b>1,86</b>
Μάρτυρες	106	99 (93,4)	7 (6,6)	0	<b>3,3</b>
Τυχαίο δείγμα	245	242 (98,78)	3 (1,22)	0	<b>0,6</b>

Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στους Πίνακες 11-13. Ειδικότερα, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων που έγινε ανίχνευση των πολυμορφισμών του *TLR4* αυτή αφορούσε ταυτόχρονα και τους δύο πολυμορφισμούς που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, 21 ασθενείς με ΧΑΠ και 8 μάρτυρες ήταν διπλοί ετεροζυγώτες φορείς των D299G και T399I πολυμορφισμών. Κατ'επέκταση 1 ασθενής έφερε μόνο τον T399I, ενώ σε 1 μάρτυρα ανιχνεύτηκε μόνο ο D299G πολυμορφισμός. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένας ασθενής ήταν ετερόζυγος ως προς και τους τρεις πολυμορφισμούς που εξετάστηκαν. Αντίστοιχα, στο τυχαίο δείγμα, μεμονωμένη ανίχνευση του D299G υπήρξε σε 1 άτομο και του T399I σε 4 άτομα. Επιπλέον, εντοπίστηκε ένας ομοζυγώτης ως προς τον D299G, ενώ ένας εξεταζόμενος ήταν ομοζυγώτης ως προς τον T399I και ταυτόχρονα ετεροζυγώτης ως προς τον D299G πολυμορφισμό. Κανένας φορέας και των τριών πολυμορφισμών ταυτόχρονα δεν εντοπίστηκε στο τυχαίο δείγμα.

Στον πληθυσμό των μαρτύρων και στο τυχαίο δείγμα διαπιστώθηκε ότι και οι τρεις πολυμορφισμοί που εξετάστηκαν ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg ( $p=1$ ).

Κατά τη σύγκριση της συχνότητας ανίχνευσης των πολυμορφισμών μεταξύ ασθενών και μαρτύρων, καθώς και μεταξύ ασθενών με και χωρίς συχνές παροξύνσεις της νόσου (πιν. 14), διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντικά συχνότερη παρουσία του *TLR4*-T399I πολυμορφισμού στους ασθενείς ( $p=0,049$ ). Επιπλέον, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του σταδίου της ΧΑΠ και της συχνής εκδήλωσης παροξύνσεων ( $p<0,001$ ).

**Πίνακας 14:** Τα αποτελέσματα της σύγκρισης της επίπτωσης των πολυμορφισμών μεταξύ ασθενών και μαρτύρων

	ΧΑΠ			Στάδιο νόσου	Συχνή εκδήλωση παροξύνσεων
	$p^*$	OR (95% CI),	$p^{**}$	$p^{*'} $	$p^*$
<i>TLR2</i> -R753Q	0,377	0,548 (0,169-1,779),	0,317	0,060	0,694
<i>TLR4</i> -D299G	0,117	2,002 (0,876-4,576),	0,1	0,242	0,775
<i>TLR4</i> -T399I	<b>0,049</b>	2,406 (1,025-5,649),	<b>0,044</b>	0,137	0,775

$p^{*'} \chi^2$  ανάλυση,  $p^*$  ακριβής δίπλευρος έλεγχος Fisher,

$p^{**}$  μονοπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση

Συνοπτικά, όπως φαίνεται στον Πίνακα 14, διαπιστώθηκε ότι:

α) οι καπνιστές-φορείς του *TLR4-T399I* πολυμορφισμού αντιμετώπιζαν 2.4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εκδηλώσουν ΧΑΠ σε σχέση με τους καπνιστές που εμφάνιζαν γονότυπο άγριου τύπου (OR: 2.406, 95% CI: 1,025-5,649). Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ( $p=0.044$ )

β) οι καπνιστές-φορείς του *TLR4-D299G* πολυμορφισμού είχαν 2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου συγκριτικά με τους καπνιστές τους ομοζυγώτες ως προς το wt αλληλίο (OR: 2.002, 95% CI:0,876-4,576), αλλά η συγκεκριμένη διαφορά δεν έφτασε τη στατιστική σημαντικότητα ( $p=0.1$ )

γ) οι καπνιστές-φορείς του *TLR2-R753Q* πολυμορφισμού βρίσκονταν σε μικρότερο κίνδυνο εκδήλωσης ΧΑΠ σε σχέση με τους καπνιστές με wt γονότυπο (OR: 0.548, 95% CI:0,169-1,779). Ωστόσο, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p=0.317$ ).

Η μη παραμετρική δοκιμασία *U* των Mann-Whitney ανέδειξε σημαντική συσχέτιση της παρουσίας του T399I πολυμορφισμού με την τιμή της σπироμετρικής παραμέτρου FEV<sub>1</sub>/FVC. Ανάλογη παρατήρηση δεν υπήρξε για τους άλλους δύο πολυμορφισμούς και για τις υπόλοιπες σπироμετρικές παραμέτρους. Αναδείχθηκε, επίσης, η συσχέτιση της ΧΑΠ με την ηλικία και την ένταση της έκθεσης στο κάπνισμα που εκφράστηκε ως pys (πιν. 15).

**Πίνακας 15:** Τα αποτελέσματα της μη παραμετρικής δοκιμασίας *U* των Mann-Whitney για τη διερεύνηση συσχέτισης των συνεχών μεταβλητών με τη ΧΑΠ και τους τρεις πολυμορφισμούς, *p*.

	ηλικία	BMI	pys	FVC
ΧΑΠ	<b>&lt;0,001</b>	0,723	<b>&lt;0,001</b>	<0,001
<i>TLR2-R753Q</i>	0,722	0,357	0,507	0,870
<i>TLR4-D299G</i>	0,843	0,813	0,391	0,779
<i>TLR4-T399I</i>	0,762	0,965	0,315	0,795

	FEV <sub>1</sub>	FEV <sub>1</sub> /FVC	FEF25-75%	PEF
ΧΑΠ	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>TLR2-R753Q</i>	0,631	0,503	0,222	0,933
<i>TLR4-D299G</i>	0,317	0,080	0,156	0,154
<i>TLR4-T399I</i>	0,203	<b>0,032</b>	0,105	0,100

**Πίνακας 16:** Συσχετίσεις ανάμεσα στις συνεχείς μεταβλητές, *p*.

	FVC	FEV <sub>1</sub>	FEV <sub>1</sub> /FVC	FEF25-75%	PEF	SatO <sub>2</sub>
ηλικία	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,017
pys	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	0,045
SatO <sub>2</sub>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ΧΑΠ αποτελεί αντικείμενο έντονου ενδιαφέροντος, δεδομένου ότι η επίπτωση και το συνολικό κοινωνικοοικονομικό βάρος εξαιτίας της εμφανίζονται να αυξάνονται. Αιτιολογικά, σχετίζεται ισχυρά με το κάπνισμα. Πρόσθετοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως οι λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος που εκδηλώνονται κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής, εκτιμάται ότι συντελούν, επίσης, στην παθογένεσή της. Ωστόσο, πληθώρα παρατηρήσεων συνηγορεί υπέρ του ότι, τελικά, οι καπνιστές ή και οι μη καπνιστές που θα αναπτύξουν τη νόσο καθορίζονται γενετικά. Μάλιστα, από αρκετές μελέτες υποστηρίζεται η σημασία των πολυμορφισμών γονιδίων αντιπρωτεασών, μεταλλοπρωτεϊνών και αναστολέων τους, ενζύμων, κυτταροκινών κ.α. στη διαμόρφωση προδιάθεσης ανάπτυξης της ΧΑΠ.

Οι υποδοχείς TLR2 και TLR4 είναι υπεύθυνοι για την αναγνώριση και την κινητοποίηση ανοσιακών απαντήσεων έναντι Gram-θετικών και -αρνητικών βακτηρίων, ιών, μυκήτων, συστατικών των φυτών και συστατικών του ξενιστή. Οι συχνότερα ανιχνευόμενοι πολυμορφισμοί των γονιδίων τους σε Καυκάσιους και οι καλύτερα μελετημένοι σε αντίστοιχους πληθυσμούς είναι οι *TLR4-Asp299Gly*, *TLR4-Thr399Ile* και *TLR2-Arg753Gln*. Όπως διεξοδικά αναλύεται στο Γενικό Μέρος, οι συγκεκριμένοι δύο πολυμορφισμοί του *TLR4* έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης λοιμώξεων από Gram-αρνητικά βακτήρια. Επιπλέον, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι η παρουσία τους επηρεάζει την παθογένεια και την εμφάνιση πλειάδας νοσημάτων, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου. Κατ' αντιστοιχία, η παρουσία του πολυμορφισμού του *TLR2* έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης φυματίωσης, ενώ ελέγχεται ο ρόλος της σε λοιμώξεις από Gram-θετικούς κόκκους και σε άλλα λοιμώδη ή μη νοσήματα.

Με βάση τα παραπάνω, η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με στόχο να αναδείξει πιθανή συσχέτιση της παρουσίας των τριών πολυμορφισμών που προαναφέρθηκαν με την ανάπτυξη της ΧΑΠ σε καπνιστές, ως συνέπεια της αυξημένης ευαισθησίας των φορέων αυτών σε λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, ιικές και βακτηριακές. Επιπλέον, διερευνήθηκε η ύπαρξη συσχέτισης με το στάδιο της νόσου και τη συχνή εκδήλωση παροξύνσεων, δεδομένου ότι οι τελευταίες πολύ συχνά είναι βακτηριακής ή ιογενούς αιτιολογίας. Οι ασθενείς και οι μάρτυρες που αποτέλεσαν το υλικό της μελέτης ήταν νυν ή πρώην καπνιστές. Αποκλείστηκαν όσοι είχαν διαγνωσμένο νόσημα η ανάπτυξη του οποίου, βιβλιογραφικά, σχετίζεται με την παρουσία των πολυμορφισμών που εξετάστηκαν, προκειμένου να αποκλειστεί τυχόν συγχυτική επίδραση από την παρουσία νοσημάτων, όπως η αθηρωμάτωση, ο σακχαρώδης διαβήτης, τα αυτοάνοσα νοσήματα και ο καρκίνος. Παράλληλα, ελέγχθηκε η επίπτωση των τριών πολυμορφισμών σε ένα τυχαίο δείγμα πληθυσμού προκειμένου να συγκριθούν τα αποτελέσματα.

Όσον αφορά και τους τρεις υπό μελέτη πολυμορφισμούς, στο τυχαίο δείγμα και στην ομάδα των μαρτύρων, διαπιστώθηκε ότι τα αλληλίου και οι γονότυποι που προκύπτουν από αυτούς βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg ( $p=1$ ), γεγονός που συνηγορεί υπέρ του

ότι πρόκειται για εξελικτικά παλιούς πολυμορφισμούς. Επιπλέον, αποτελεί σημαντικό κριτήριο θετικής αποτίμησης του σχεδιασμού της μελέτης [290].

Η συχνότητα με την οποία εντοπίζεται στην ομάδα των μαρτύρων το 299Gly αλληλίο του *TLR4* είναι 4,2% και το 399Ile αλληλίο 3,7%. Αυτές οι συχνότητες είναι σε συμφωνία με τις αναφερόμενες για πληθυσμούς Ευρωπαϊκής καταγωγής στην ιστοσελίδα του International HarMap Project, δηλαδή 3,5% και 4,5% αντίστοιχα. Στο τυχαίο δείγμα οι συχνότητες και των δύο πολυμορφικών αλληλίων ήταν 6,3%. Η απόκλιση από τις προαναφερόμενες δεν είναι σημαντική.

Οι D299G και T399I είναι σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) ( $r^2=0.742$ ,  $D'=1.0$  βάσει του HarMap Rel27 B36 b126). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ανισορροπία σύνδεσης είναι πιθανό να οφείλεται στη μικρή πραγματική απόσταση των δύο πολυμορφισμών στο γονίδιο του *TLR4*.

Στις περιπτώσεις που υπήρξε ανίχνευση των πολυμορφισμών του *TLR4* κατά κανόνα αφορούσε ταυτόχρονα και τους δύο, D299G και T399I, και στις τρεις ομάδες που εξετάστηκαν, δηλαδή τους ασθενείς, τους μάρτυρες και το τυχαίο δείγμα του πληθυσμού. Το συγκεκριμένο εύρημα είναι σε συμφωνία με όσα είναι ήδη γνωστά από τη βιβλιογραφία και αναφέρθηκαν εκτενώς στο Γενικό Μέρος, σχετικά με την κοινή γενετική απομόνωσή τους.

### **Πολυμορφισμός *TLR4*-Thr399Ile**

Το κυριότερο αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης είναι η συσχέτιση της παρουσίας του *TLR4*-Thr399Ile πολυμορφισμού με την ανάπτυξη της ΧΑΠ σε καπνιστές, η οποία, σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε, αναδεικνύεται πρώτη φορά. Συγκεκριμένα, οι καπνιστές-φορείς του Thr399Ile πολυμορφισμού διαπιστώθηκε ότι βρίσκονται σε 2,4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ΧΑΠ σε σχέση με τους ομοζυγώτες ως προς το wt αλληλίο. Επιπλέον, προέκυψε συσχέτισή του με την τιμή FEV<sub>1</sub>/FVC που προσδιορίζεται με τη σπιρομέτρηση ( $p=0,032$ ).

Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται ότι επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση. Ειδικότερα, πληθώρα ερευνητικών αποτελεσμάτων συνηγορεί υπέρ του ότι ο T399I πολυμορφισμός καθιστά τους φορείς του περισσότερο ευάλωτους σε λοιμώξεις από Gram-αρνητικά βακτήρια και ότι αυξάνει την ευαισθησία παιδιών σε λοιμώξεις από RSV. Ανάλογες λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος κατά την παιδική ηλικία αποτελούν παράγοντες υποβάθμισης της αναπνευστικής λειτουργίας του ατόμου κατά την ενήλικη ζωή και θεωρείται ότι προδιαθέτουν στην ανάπτυξη της ΧΑΠ. Επομένως, η παρουσία του T399I πολυμορφισμού, ευνοώντας την εκδήλωση των συγκεκριμένων λοιμώξεων, είναι δυνατό να προδιαθέτει τους φορείς του σε ευαισθησία στην επακόλουθη βλαπτική επίδραση του καπνίσματος κατά την ενήλικη ζωή και κατ'επέκταση στην ανάπτυξη ΧΑΠ. Δυστυχώς στην παρούσα μελέτη δεν είχαμε τη δυνατότητα να εξακριβώσουμε αν κατά την παιδική ηλικία οι συμμετέχοντες εμφάνιζαν συχνές ή σοβαρές λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος ώστε να εξετάσουμε περαιτέρω τη συγκεκριμένη υπόθεση.

Σε συνδυασμό με αυτά, η βασιμότητα του αποτελέσματος της μελέτης μας υποστηρίζεται και από τη διαπιστωμένη συμμετοχή μικροοργανισμών στην παθοφυσιολογία της ΧΑΠ. Είναι γνωστό ότι το τραχειοβρογχικό δέντρο των ασθενών με σταθερή νόσο χαρακτηρίζεται από χρόνια αποικισμό από διάφορα παθογόνα. Ο TLR4 ευθύνεται για την αναγνώριση αρκετών από αυτά, όπως του *H. influenzae*, της *M. catarrhalis*, και του RSV. Οποιαδήποτε διαταραχή της ικανότητάς του να κινητοποιεί ανοσιακή απάντηση έναντι αυτών είναι πιθανό ότι συνοδεύεται από ελαττωμένη ικανότητα κάθαρσης των παθογόνων. Στην προκειμένη περίπτωση, αυτή επάγεται από τροποποίηση της δομής της εξωκυττάριας περιοχής του υποδοχέα εξαιτίας της παρουσίας του T399I πολυμορφισμού, η οποία ενδεχομένως βλάπτει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τους συνδέτες του. Μάλιστα, έχει διαπιστωθεί ότι πειραματόζωα με μεταλλάξεις του *TLR4* εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα κάθαρσης των παθογόνων *H. influenzae* και *E.coli* [291, 292], γεγονός που ενισχύει τη θέση μας. Προτείνεται, επομένως, ότι η παρουσία του T399I πολυμορφισμού συνεπάγεται την παράταση της παραμονής των παθογόνων στις αεροφόρες οδούς και τροφοδοτεί τη λειτουργία ενός φαύλου κύκλου που συντελεί στην ανάπτυξη της ΧΑΠ.

Περαιτέρω υποστήριξη του αποτελέσματος της παρούσας μελέτης παρέχει η διαπίστωση της εμπλοκής του TLR4 στην ανάπτυξη της επαγόμενης από το κάπνισμα πνευμονικής φλεγμονής. Η τελευταία έχει δείχθει ότι είναι TLR4/MyD88 μεσολαβούμενη και διεγερόμενη από αύξηση της απελευθέρωσης Hsp70 [293]. Επιπλέον, εκτιμάται ότι περίπου 1% της συνολικής ποσότητας LPS που περιέχεται στο τσιγάρο παραμένει βιολογικά δραστική και εναποτίθεται στους πνεύμονες κατά το κάπνισμα. Η αναγνώριση και η κινητοποίηση ανοσιακής απάντησης έναντι αυτής μεσολαβείται από τον TLR4 [294]. Σε συνδυασμό με αυτά, σε πειραματόζωα έχει αποδειχθεί η σημασία της λειτουργίας του TLR4 στην προστασία των δομών του πνεύμονα. Η αδυναμία των ζώων να εκφράσουν τον υποδοχέα διαπιστώθηκε ότι οδηγεί στην ανάπτυξη εμφυσήματος, μέσω αύξησης της έκφρασης μιας NADPH οξειδάσης, της Nox3, στους πνεύμονες [295]. Κατ' επέκταση, ενισχύεται η υπόθεσή μας ότι και άλλες διαταραχές του υποδοχέα, στην προκειμένη περίπτωση η προκαλούμενη εξαιτίας της παρουσίας του T399I πολυμορφισμού, είναι δυνατό να συμβάλλουν στην ανάπτυξη αποφρακτικής διαταραχής.

### **Πολυμορφισμός *TLR4-Asp299Gly***

Από την παρούσα μελέτη δεν προέκυψε συσχέτιση της παρουσίας του D299G πολυμορφισμού με την ανάπτυξη της ΧΑΠ σε καπνιστές. Ειδικότερα, η παρουσία του συσχετίστηκε με 2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου, αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε αντίθεση με το αντίστοιχο της μελέτης των Rohde et al, οι οποίοι ανίχνευσαν τον πολυμορφισμό με μειωμένη συχνότητα μεταξύ ασθενών με ΧΑΠ συγκριτικά με μάρτυρες [296]. Ωστόσο, το συγκεκριμένο εύρημα πρέπει να αντιμετωπιστεί με σκεπτικισμό, δεδομένου ότι, στην τελευταία μελέτη, η ομάδα των μαρτύρων περιελάμβανε τόσο καπνιστές όσο και μη καπνιστές. Επιπλέον, δεν αναφέρεται αν για την επιλογή των συμμετεχόντων καθορίστηκε ένα ελάχιστο ηλικιακό όριο και ιστορικό καπνίσμα-



τος αυτών. Αντίθετα, κατά το σχεδιασμό της παρούσας μελέτης, το κάπνισμα θεωρήθηκε ως πρωταρχικός παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης της νόσου και αποτέλεσε σταθερό χαρακτηριστικό των συμμετεχόντων. Επιπρόσθετα, έγινε επισταμένη προσπάθεια αντιστοίχισης των ατόμων που αποτέλεσαν τις ομάδες των ασθενών και των μαρτύρων, αναφορικά με την ηλικία και τα yrs, και αποκλεισμού συνύπαρξης συγκεκριμένων νοσημάτων. Στην περίπτωση της μελέτης των Sabroe et al δεν προέκυψε συσχέτιση της παρουσίας του D299G πολυμορφισμού με την αναπνευστική λειτουργία [297]. Στην τελευταία, εξετάστηκε ένας πληθυσμός 289 καπνιστών ηλικίας άνω των 40 ετών, με ελάχιστο ιστορικό καπνίσματος τα 10 yrs. Ενδεχομένως, τα κατώτερα όρια που προαναφέρθηκαν ήταν αρκετά χαμηλά, ώστε να επηρεάσουν το αποτέλεσμα, υπό την έννοια ότι ένας κανιστής 40 ετών με ιστορικό 10 yrs είναι αρκετά πιθανό να μην εμφανίσει απόφραξη κατά τη σπιρομέτρηση. Επιπλέον, οι μελετητές απέφυγαν να χαρακτηρίσουν τους συμμετέχοντες ως ασθενείς με ΧΑΠ, δεν διέθεσαν πληροφορίες σχετικά με τα κλινικά δεδομένα και τα σπιρομετρικά ευρήματα και τους συνέκριναν με βάση τον FEV<sub>1</sub>.

### **Πολυμορφισμοί του *TLR4***

Με δεδομένα τα ευρήματα για τον πολυμορφισμό T399I το αποτέλεσμα για τον D299G φαίνεται καταρχήν ασύμφωνο, καθώς οι δύο πολυμορφισμοί αφενός συνήθως γενετικά απομονώνονται ταυτόχρονα αφετέρου επηρεάζουν και οι δύο τη δομή του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα. Μάλιστα, τα συμπεράσματα προηγούμενων μελετών, στις οποίες ελέγχονται ταυτόχρονα σε σχέση με λοιμώδη ή μη νοσήματα, πολύ συχνά είναι κοινά για τους δύο πολυμορφισμούς, όπως εκτενώς παρουσιάστηκε στο Γενικό Μέρος. Ωστόσο, δεδομένου ότι σε κάποιες περιπτώσεις ανιχνεύονται και ανεξάρτητα, θεωρείται πιθανό ότι, τελικά, επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο ποικιλία νοσημάτων και θεραπευτικών παρεμβάσεων. Το γεγονός αυτό έχει δειχθεί, για παράδειγμα, σε μελέτες συσχέτισης με την εμφάνιση OEM, την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με στατίνες κ.ά. Επίσης, μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό, σε σχέση με την ανάπτυξη φλεγμονώδους νόσου του εντέρου, κατέδειξε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του 299Gly, αλλά όχι και του 399Ile, αλληλίου σε ασθενείς με νόσο του Crohn [298].

Το αποτέλεσμα της μελέτης μας φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με την επικρατούσα άποψη ότι η παρουσία του *TLR4*-D299G είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνη για τη διαταραχή της λειτουργίας του υποδοχέα. Αυτό το εύρημα προέκυψε κατά την εξέταση της σχέσης της παρουσίας των συγκεκριμένων πολυμορφισμών του *TLR4* με τη διαδικασία της αθηρωγένεσης και με την ανάπτυξη σηπτικού shock από Gram-αρνητικά βακτήρια. Συγκεκριμένα προτάθηκε ότι στους φορείς μεμονωμένα του πολυμορφισμού D299G παραβλάπτεται σημαντικά η λειτουργικότητα του υποδοχέα, ενώ η ταυτόχρονη παρουσία του T399I είτε δεν επηρεάζει [176], είτε επενεργεί ευνοϊκά [299] ώστε τελικά ο υποδοχέας να εκδηλώνει ενδιάμεση λειτουργικότητα. Επιπλέον, *in vitro*, διαπιστώθηκε ότι σε κύτταρα φέροντα τον D299G η διέγερση με LPS προκαλούσε πολύ μικρή ενεργοποίηση του NF-κΒ, ενώ σε κύτταρα με τον T399I πολυμορφισμό μεγαλύτερη ενεργοποίηση, αν και όχι στα επίπεδα των wt κυττάρων [168]. Σε

αντίθεση με τα προαναφερόμενα, με την παρούσα μελέτη ενισχύεται η εκτίμηση ότι η παρουσία του πολυμορφισμού T399I είναι τελικά η καθοριστική για την επαγωγή διαταραχής της λειτουργικότητας του TLR4. Ανάλογο αποτέλεσμα αναφέρεται από τους Török et al [300] σε σχέση με την ελκώδη κολίτιδα. Από την τελευταία μελέτη προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού T399I με την ελκώδη κολίτιδα. Αντίθετα, η αυξημένη συχνότητα παρουσίας του αλληλίου 299Gly στους ασθενείς δεν έφτασε τη στατιστική σημαντικότητα, όπως προέκυψε και από τα δικά μας πειράματα.

Είναι απαραίτητο να τονιστεί ότι το μικρό μέγεθος των ομάδων των ασθενών και των μαρτύρων ενδέχεται να αποτέλεσε παράγοντα επηρεασμού των τελικών αποτελεσμάτων μας, υπό την έννοια ότι δεν επέτρεψε να επιβεβαιωθεί και στατιστικά η διαφαινόμενη σημασία και του D299G πολυμορφισμού στην ανάπτυξη της νόσου. Το μέγεθος του δείγματος που εξετάσαμε ήταν παρεμφερές εκείνου που ελέγχθηκε στη μελέτη των Török et al [300]. Πρέπει να αναφερθεί ότι το τελευταίο ήταν μικρότερο συγκριτικά με δείγματα άλλων μελετών που διερεύνησαν πιθανή σημασία των πολυμορφισμών του *TLR4* στη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και οι οποίες ανέδειξαν, τελικά, συσχέτιση και του D299G πολυμορφισμού με τη νόσο. Ενισχύεται, επομένως, η εκτίμηση ότι μεγαλύτερο δείγμα και στη δική μας μελέτη θα οδηγούσε σε ασφαλέστερα συμπεράσματα.

### **Πολυμορφισμός *TLR2*-Arg753Gln**

Ο πολυμορφισμός R753Q δεν συσχετίστηκε με την ανάπτυξη της ΧΑΠ σε καπνιστές. Η παρουσία του φάνηκε να λειτουργεί προστατευτικά (OR: 0,548, 95% CI: 0,169-1,779), σε αντίθεση με τους πολυμορφισμούς του *TLR4*, αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η παρουσία του συγκεκριμένου πολυμορφισμού επηρεάζει το ενδοκυττάριο τμήμα του TLR2. Επιπλέον, η ανεπάρκεια του TLR2 σε πειραματόζωα έχει αποδειχθεί ότι δεν συνοδεύεται από διαταραχή της κάθαρσης του *Str. pneumoniae*, παρά μόνο από ήπιο περιορισμό της φλεγμονώδους απάντησης [301]. Οι προαναφερόμενες διαφορές, σε σχέση με όσα ήδη αναφέρθηκαν για τον TLR4, ενδεχομένως προμηνύουν και διαφορετικό αποτέλεσμα, όπως και παρατηρήθηκε. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να τονιστεί ότι η συχνότητα ανεύρεσης του R753Q ήταν πολύ μικρότερη από τις αντίστοιχες των D299G και T399I. Κατ'επέκταση απαιτείται η εξέταση πολύ μεγαλύτερου δείγματος προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Από τη μελέτη των Pabst et al διαπιστώθηκε επίσης απουσία συσχέτισης της ΧΑΠ με τον R753Q πολυμορφισμό [302]. Ο σχεδιασμός της τελευταίας ήταν αρκετά διαφορετικός από τον αντίστοιχο της παρούσας, καθώς συμπεριέλαβε και μη καπνιστές, ενώ κατά μέσο όρο τα yrs των ασθενών ήταν σημαντικά περισσότερα συγκριτικά με των μαρτύρων. Ωστόσο, το αποτέλεσμα είναι παρόμοιο με το δικό μας, γεγονός που ενισχύει σημαντικά τη βσιμότητα του συμπεράσματός μας.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας είναι η σημαντική απόκλιση των συχνοτήτων ανίχνευσης του πολυμορφισμού R753Q ανάμεσα στην ομάδα των μαρτύρων και στο τυχαίο

δείγμα του πληθυσμού. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα οφείλεται ξεκάθαρα στον τρόπο επιλογής του υλικού μας. Ειδικότερα, στο τυχαίο δείγμα εκπροσωπούνταν και τα δύο φύλα σε αναλογία 44,49%:55,51% υπέρ των γυναικών, ενώ στην ομάδα των μαρτύρων με αναλογία 96,23%:3,77% αντίστοιχα. Καμία από τις γυναίκες που ελέγχθηκαν δεν ήταν φορέας του πολυμορφισμού R753Q, γεγονός που οδήγησε στην παρατηρούμενη απόκλιση. Καθίσταται, έτσι, και πάλι σαφής η σημασία του καθορισμού κριτηρίων εισαγωγής και αποκλεισμού κατά το σχεδιασμό μελετών ασθενών-μαρτύρων.

### **Φαινότυπος της ΧΑΠ**

Στη μελέτη μας δεν διαπιστώσαμε συσχέτιση της παρουσίας των τριών υπό εξέταση πολυμορφισμών με το στάδιο της νόσου και τη συχνότητα των παροξύνσεων ανά έτος που εκδηλώνουν οι ασθενείς. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, τα κυριότερα αίτια των παροξύνσεων είναι βακτήρια, ιοί, οι αλλαγές της θερμοκρασίας και η αύξηση της μόλυνσης του περιβάλλοντος αέρα. Ανάμεσα στα βακτήρια συνηθέστερα απομονώνονται ως υπεύθυνα για παροξύνσεις τα *H. influenzae*, *Str. pneumoniae*, *M. catarrhalis* και *Ps. aeruginosa*. Επιπλέον, η ευθύνη των ιών αναγνωρίζεται πλέον συχνότερα με τη χρήση RT-PCR συγκριτικά με παλαιότερες μελέτες που βασίζονταν σε ορολογικές εκτιμήσεις και καλλιέργειες. Ρινοϊοί αναγνωρίζονται ως υπεύθυνοι παράγοντες σε ποσοστό >50% των περιπτώσεων στις οποίες οι παροξύνσεις οφείλονται σε ιούς. Συχνά, επίσης, ενοχοποιείται ο RSV, ενώ σε πολύ μικρότερα ποσοστά φαίνεται ότι ευθύνονται άλλοι ιοί όπως οι Influenza virus και Parainfluenza viruses [303]. Η αναγνώριση αρκετών από τους προαναφερόμενους μικροοργανισμούς μεσολαβείται από τους TLR2 και TLR4 και οι πολυμορφισμοί που μελετούμε, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σχετίζονται με συχνότερη προσβολή των φορέων από αντίστοιχες λοιμώξεις. Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, θα περιμέναμε οι φορείς των πολυμορφισμών να εκδηλώνουν συχνότερα παροξύνσεις της ΧΑΠ σε σχέση με τους ομοζυγώτες ως προς το wt αλληλίο ασθενείς. Η απουσία συσχέτισης που προκύπτει είναι δυνατό να οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες. Πρώτον, δεν ήταν γνωστά στην παρούσα μελέτη τα αίτια των παροξύνσεων των ασθενών, αλλά μόνο η συχνότητα αυτών. Είναι λογικό ότι στην περίπτωση που αυτές πυροδοτήθηκαν από μικροοργανισμούς που δεν κινητοποιούν ανοσιακή απάντηση μέσω των TLR4 και TLR2 οι πολυμορφισμοί που εξετάζουμε δεν ήταν δυνατό να επηρεάσουν τη συχνότητά τους. Δεύτερον, η παρουσία των πολυμορφισμών του *TLR4* φαίνεται ότι επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο την ανοσιακή απάντηση που διεγείρεται από LPS διαφορετικής βακτηριακής προέλευσης [172]. Κατ'επέκταση, ενδεχομένως η παρουσία τους να μην επηρεάζει τη φλεγμονώδη διεργασία έναντι LPS των συγκεκριμένων βακτηρίων που προκάλεσαν τις παροξύνσεις στην ομάδα των ασθενών που μελετήσαμε. Σε αυτή την περίπτωση δεν επηρέασε την εκδήλωση των παροξύνσεων και κατ'επέκταση τη συχνότητά τους. Τρίτον, το δείγμα των 134 ασθενών είναι μικρό και, επομένως, η αναζήτηση συσχέτισης καθίσταται δυσχερής. Η εξέταση περισσότερων ασθενών κρίνεται απαραίτητη. Τέταρτον, δεν πρέπει να αποκλείεται η πιθανότητα οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί να μην επηρεάζουν τελικά την ευαισθησία των φορέων σε λοιμώξεις

και κατ' επέκταση και τη συχνότητα των προκαλούμενων από μικροοργανισμούς παροξύνσεων. Εξάλλου, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Γενικό Μέρος, αρκετές μελέτες καταλήγουν σε αδυναμία ανάδειξης οποιασδήποτε συσχέτισης των πολυμορφισμών που μελετούμε με πληθώρα, λοιμωδών και μη, νοσημάτων.

### **Συμπεράσματα και προοπτικές**

Στα πλαίσια διερεύνησης της γενετικής επιβάρυνσης που υπόκειται της ΧΑΠ, επιδιώξαμε, με το σχεδιασμό μιας μελέτης ασθενών-μαρτύρων, να αναζητήσουμε πιθανή συσχέτιση της παρουσίας πολυμορφισμών των *TLR2* και *TLR4* με την ανάπτυξη και την εκδήλωση της ΧΑΠ σε καπνιστές. Παράλληλα, εξετάσαμε την επίπτωση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών σε ένα τυχαίο δείγμα πληθυσμού και συγκρίναμε τα αποτελέσματα με τα αντίστοιχα στις ομάδες των ασθενών και των μαρτύρων.

Οι *TLR4*-D299G και *TLR4*-T399I πολυμορφισμοί ανιχνεύτηκαν συχνότερα ανάμεσα στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες, ενώ ο *TLR2*-R753Q πολυμορφισμός σπανιότερα. Ωστόσο, η διαφορά έφτασε τη στατιστική σημαντικότητα μόνο για τον T399I πολυμορφισμό, ο οποίος συσχετίστηκε με την ανάπτυξη της ΧΑΠ σε καπνιστές ( $p = 0,044$ ). Κανένας από τους τρεις πολυμορφισμούς δεν συσχετίστηκε με το στάδιο της νόσου και τη συχνή εκδήλωση παροξύνσεων εκ μέρους των ασθενών. Δεδομένης της σημασίας των λοιμώξεων στην παθογένεση της ΧΑΠ, το εύρημά μας πιθανά υποδηλώνει ότι λειτουργικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων της φυσικής ανοσίας ενδέχεται να επηρεάζουν την ανάπτυξη της ΧΑΠ σε καπνιστές.

Ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης μας ήταν η αδυναμία ανίχνευσης του R753Q πολυμορφισμού ανάμεσα στις γυναίκες που περιλαμβάνονταν τόσο στις ομάδες των ασθενών και των μαρτύρων όσο και στο τυχαίο δείγμα πληθυσμού που εξετάσαμε.

Ως περιορισμός της παρούσας μελέτης πρέπει να θεωρηθεί το σχετικά μικρό μέγεθος του δείγματος των ασθενών και των μαρτύρων που απορρέει από τα αυστηρά κριτήρια που καθορίσαμε για την επιλογή του υλικού μας. Οι συχνότητες ανίχνευσης των τριών πολυμορφισμών, ιδιαίτερα του *TLR2*-R753Q, επιβάλλουν την αναμονή επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων σε πιο εκτεταμένο πληθυσμό.

Ενδιαφέρον θα είχε η επέκταση της μελέτης των συγκεκριμένων πολυμορφισμών και σε μη καπνιστές ασθενείς με ΧΑΠ, προκειμένου να εκτιμήσουμε την επίδρασή της παρουσίας τους ανεξάρτητα από το κάπνισμα, υπό διαφορετικό, βέβαια, σχεδιασμό της μελέτης.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΣΚΟΠΟΣ της μελέτης ήταν να διερευνηθεί αν η παρουσία των πολυμορφισμών *TLR2*-Arg753Gln, *TLR4*-Asp299Gly και *TLR4*-Thr399Ile σχετίζεται με την ανάπτυξη ΧΑΠ σε καπνιστές, με το στάδιο της νόσου και με τη συχνή εκδήλωση παροξύνσεων εκ μέρους των ασθενών. Παράλληλα, να προσδιοριστεί η επίπτωσή τους σε ένα τυχαίο δείγμα πληθυσμού προκειμένου να συγκριθεί με την αντίστοιχη στις ομάδες των ασθενών και των μαρτύρων.

ΥΛΙΚΟ Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 240 νυν ή πρώην καπνιστές, ηλικίας άνω των 40 ετών, με κατώτερο όριο έκθεσης στο κάπνισμα τα 20 ργς. Μεταξύ αυτών οι 136 ανέπτυξαν ΧΑΠ, ενώ οι 104 όχι. Κριτήριο αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν το ιστορικό άσθματος ή ατοπίας, αυτοάνοσων νοσημάτων, καρκίνου και νοσημάτων συνδεδεμένων με την αθηρωμάτωση (ισχαιμική καρδιοπάθεια, υπέρταση, ανευρύσματα κ.ά.). Το τυχαίο δείγμα αποτέλεσε γενετικό υλικό 245 ατόμων προερχόμενο από το αρχείο του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας.

ΜΕΘΟΔΟΣ Όλοι οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε σπιρομέτρηση ακολουθούμενη από λήψη δείγματος φλεβικού αίματος, από το οποίο έγινε απομόνωση DNA. Η ανίχνευση των πολυμορφισμών *TLR4*-D299G και *TLR4*-T399I έγινε με πρωτόκολλο PCR-RFLP, ενώ του *TLR2*-R753Q με πρωτόκολλο AS-PCR ή PCR-RFLP. Τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων. Η αναζήτηση συσχετίσεων έγινε με τη χρήση μονοπαραγοντικής λογιστικής παλινδρόμησης. Η σύγκριση των συνεχών μεταβλητών έγινε με μη παραμετρική δοκιμασία U των Mann-Whitney.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (α) Η παρουσία του πολυμορφισμού *TLR4*-T399I συσχετίστηκε με 2,4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ΧΑΠ και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ( $p=0,044$ ). Επιπλέον, συσχετίστηκε με την τιμή της σπιρομετρικής παραμέτρου  $FEV_1/FVC$  ( $p=0,032$ ). (β) Η παρουσία του *TLR4*-D299G συσχετίστηκε με 2 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ΧΑΠ, αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p=0,1$ ). (γ) Ο *TLR2*-R753Q ανιχνεύτηκε σπανιότερα ανάμεσα στους ασθενείς συγκριτικά με τους μάρτυρες, αλλά η διαφορά δεν έφτασε τη στατιστική σημαντικότητα ( $p=0,317$ ). Επιπρόσθετα, δεν ανιχνεύτηκε σε καμία από τις γυναίκες που συμπεριλήφθηκαν στις υπό εξέταση ομάδες. (ε) Κανένας από τους τρεις πολυμορφισμούς δεν συσχετίστηκε με το στάδιο της νόσου και τη συχνή εκδήλωση παροξύνσεων των ασθενών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Η παρουσία του πολυμορφισμού *TLR4*-T399I σχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ΧΑΠ σε καπνιστές. Το αποτέλεσμά μας υπογραμμίζει τη σημασία της διαταραχής της φυσικής ανοσίας στην παθογένεση της ΧΑΠ. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση της εξαιρετικά ελαττωμένης επίπτωσης του *TLR2*-R753Q ανάμεσα στις γυναίκες, εύρημα που αξίζει περαιτέρω διερεύνησης.

## ABSTRACT

### ***TLR2 and TLR4 SNPs in chronic obstructive pulmonary disease***

*Vasiliki Merentiti*

Faculty of Medicine – School of Health Sciences

University of Thessaly

Department of Immunology & Histocompatibility

(Director: Prof. A.E. Germenis)

and

Respiratory Medicine Department

(Director: Prof. K.I. Gourgoulianis)

**OBJECTIVE** of the study was to investigate whether the presence of *TLR2*-Arg753Gln, *TLR4*-Asp299Gly and *TLR4*-Thr399Ile is associated with COPD development in smokers, disease stage and frequency of patients' exacerbations. Moreover, to define the prevalence of the polymorphisms mentioned above in a randomly selected population and to compare it with the corresponding in the patients and control groups.

**MATERIAL** 240 heavy smokers (>20 pys), without overt atherosclerosis disease, atopy, autoimmune disease and cancer, of whom 136 had developed COPD and 104 not, constituted the patients and control groups, respectively. 245 archive DNA samples, property of Immunology & Histocompatibility Department, comprised the randomly selected population.

**METHODS** Participants were subjected to spirometry and standard venipuncture. DNA was extracted from whole blood. Detection of *TLR4*-D299G and *TLR4*-T399I was carried out by PCR-RFLP protocol and of *TLR2*-R753Q by AS-PCR or PCR-RFLP protocol. Sequencing confirmed our results. Associations were tested using a univariate logistic regression model. Continuous variables were compared using the non-parametric Mann-Whitney U-test.

**RESULTS** (a) *TLR4*-T399I was associated with 2.4-fold increased risk for COPD development and the difference was statistically significant ( $p=0.044$ ). Moreover, it was strongly associated with the value of FEV<sub>1</sub>/FVC ratio ( $p=0.032$ ). (b) *TLR4*-D299G was associated with 2.0-fold increased risk for COPD development, but the difference was not statistically significant ( $p=0.061$ ). (c) *TLR2*-R753Q was less frequently detected in the patients group compared with controls, but the difference failed to reach statistical significance ( $p=0.317$ ). Besides that, it was not detected in any of the women included in the groups examined. (d) None of the three SNPs associated with disease stage or frequency of exacerbations.

**CONCLUSION** *TLR4*-T399I associates with increased risk for COPD development in smokers. This finding underscores the importance of impaired innate immunity on COPD development. Moreover, really interesting is the observation that *TLR2*-R753Q appears rarely among women, which deserves more examination.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. DAVIS RM, NOVOTNY TE. Changes in risk factors: the epidemiology of cigarette smoking and its impact on chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1989, 140:S82-S84.
2. MANNINO DM, BUIST AS, PETTY TL, ENRIGHT PL, REDD SC. Lung function and mortality in the United States: data from the First National Health and Nutrition Examination Survey follow up study. *Thorax* 2003, 58:388-93.
3. MANNINO DM. COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity. *Chest* 2002, 121(5 Suppl):121S-126S.
4. LOPEZ AD, MURRAY CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 1998, 4:1241-1243.
5. MORGAN WJ. Maternal smoking and infant lung function. Further evidence for an in utero effect. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 158:689-690.
6. HOLT PG. Immune and inflammatory function in cigarette smokers. *Thorax* 1987, 42:241-249.
7. CAMILLI AE, BURROWS B, KNUDSON RJ, LYLE SK, LEBOWITZ MD. Longitudinal changes in forced expiratory volume in one second in adults. Effects of smoking and smoking cessation. *Am Rev Respir Dis* 1987, 135:794-799.
8. LEUENBERGER P, SCHWARTZ J, ACKERMANN-LIEBRICH U, BLASER K, BOLOGNINI G, BONGARD JP, et al. Passive smoking exposure in adults and chronic respiratory symptoms (SAPALDIA Study). Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults, SAPALDIA Team. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 150(5 Pt 1):1222-1228.
9. BARKER DJ, GODFREY KM, FALL C, OSMOND C, WINTER PD, SHAHEEN SO. Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ* 1991, 303:671-675.
10. BURROWS B, KNUDSON RJ, LEBOWITZ MD. The relationship of childhood respiratory illness to adult obstructive airway disease. *Am Rev Respir Dis* 1977, 115:751-760.
11. BURROWS B, KNUDSON RJ, CLINE MG, LEBOWITZ MD. A reexamination of risk factors for ventilatory impairment. *Am Rev Respir Dis* 1988, 138:829-836.
12. POSTMA DS, DE VRIES K, KOËTER GH, SLUITER HJ. Independent influence of reversibility of air-flow obstruction and nonspecific hyperreactivity on the long-term course of lung function in chronic air-flow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1986, 134:276-280.
13. POSTMA DS, KERSTJENS HA. Are inhaled glucocorticosteroids effective in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 160(5 Pt 2):S66-S71.
14. PALMER LJ, RYE PJ, GIBSON NA, BURTON PR, LANDAU LI, LESOUËF PN. Airway responsiveness in early infancy predicts asthma, lung function, and respiratory symptoms by school age. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163:37-42.
15. HIGGINS M, KELLER J. Familial occurrence of chronic respiratory disease and familial resemblance in ventilatory capacity. *J Chronic Dis* 1975, 28:239-251.
16. TAGER I, TISHLER PV, ROSNER B, SPEIZER FE, LITT M. Studies of the familial aggregation of chronic bronchitis and obstructive airways disease. *Int J Epidemiol* 1978, 7:55-62.
17. SPEIZER FE, ROSNER B, TAGER I. Familial aggregation of chronic respiratory disease: use of National Health Interview Survey data for specific hypothesis testing. *Int J Epidemiol* 1976, 5:167-172.

- 
18. KUEPPERS F, MILLER RD, GORDON H, HEPPER NG, OFFORD K. Familial prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in a matched pair study. *Am J Med* 1977, 63:336-342.
  19. LARSON RK, BARMAN ML, KUEPPERS F, FUDENBERG HH. Genetic and environmental determinants of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 1970, 72:627-632.
  20. COHEN BH, DIAMOND EL, GRAVES CG, KREISS P, LEVY DA, MENKES HA, et al. A common familial component in lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 1977, 2:523-536.
  21. REDLINE S, TISHLER PV, ROSNER B, LEWITTER FI, VANDENBURGH M, WEISS ST, et al. Genotypic and phenotypic similarities in pulmonary function among family members of adult monozygotic and dizygotic twins. *Am J Epidemiol* 1989, 129:827-836.
  22. REDLINE S, TISHLER PV, LEWITTER FI, TAGER IB, MUNOZ A, SPEIZER FE. Assessment of genetic and nongenetic influences on pulmonary function. A twin study. *Am Rev Respir Dis* 1987, 135:217-222.
  23. WEBSTER PM, LORIMER EG, MAN SF, WOOLF CR, ZAMEL N. Pulmonary function in identical twins: comparison of nonsmokers and smokers. *Am Rev Respir Dis* 1979, 119:223-228.
  24. HANKINS D, DRAGE C, ZAMEL N, KRONENBERG R. Pulmonary function in identical twins raised apart. *Am Rev Respir Dis* 1982, 125:119-121.
  25. GIVELBER RJ, COUROPMITREE NN, GOTTLIEB DJ, EVANS JC, LEVY D, MYERS RH, et al. Segregation analysis of pulmonary function among families in the Framingham Study. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157(5 Pt 1):1445-1451.
  26. MCCLOSKEY SC, PATEL BD, HINCHLIFFE SJ, REID ED, WAREHAM NJ, LOMAS DA. Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164(8 Pt 1):1419-1424.
  27. SILVERMAN EK, CHAPMAN HA, DRAZEN JM, WEISS ST, ROSNER B, CAMPBELL EJ, et al. Genetic epidemiology of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157(6 Pt 1):1770-1778.
  28. JOOST O, WILK JB, CUPPLES LA, HARMON M, SHEARMAN AM, BALDWIN CT, et al. Genetic loci influencing lung function: a genome-wide scan in the Framingham Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 165:795-799.
  29. WILK JB, DESTEFANO AL, ARNETT DK, RICH SS, DJOUSSE L, CRAPO RO, et al. A genome-wide scan of pulmonary function measures in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 167(11):1528-33.
  30. SILVERMAN EK, PALMER LJ, MOSLEY JD, BARTH M, SENTER JM, BROWN A et al. Genomewide linkage analysis of quantitative spirometric phenotypes in severe early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum Genet* 2002, 70:1229-1239.
  31. SILVERMAN EK, MOSLEY JD, PALMER LJ, BARTH M, SENTER JM, BROWN A. Genome-wide linkage analysis of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease: airflow obstruction and chronic bronchitis phenotypes. *Hum Mol Genet* 2002, 11:623-632.
  32. PALMER LJ, CELEDÓN JC, CHAPMAN HA, SPEIZER FE, WEISS ST, SILVERMAN EK. Genome-wide linkage analysis of bronchodilator responsiveness and post-bronchodilator spirometric phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Mol Genet* 2003, 12:1199-1210.



- 
33. DEMEO DL, CELEDÓN JC, LANGE C, REILLY JJ, CHAPMAN HA, SYLVIA JS, et al. Genome-wide linkage of forced mid-expiratory flow in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 170:1294-1301.
  34. CARELL RW. The molecular structure and pathology of alpha 1-antitrypsin. *Lung* 1990, 168 Suppl:530-534.
  35. COX DW, JOHNSON AM, FAGERHOL MK. Report of Nomenclature Meeting for alpha 1-antitrypsin, INSERM, Rouen/Bois-Guillaume-1978. *Hum Genet* 1980, 53:429-433.
  36. FAGERHOL MK, TENFJORD OW. Serum Pi types in some European, American, Asian and African populations. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1968, 72:601-608.
  37. MAHADEVA R, LOMAS DA. Genetics and respiratory disease. 2. Alpha 1-antitrypsin deficiency, cirrhosis and emphysema. *Thorax* 1998, 53:501-505.
  38. JANUS ED, PHILLIPS NT, CARRELL RW. Smoking, lung function, and alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 1985, 1:152-154.
  39. BRANTLY ML, PAUL LD, MILLER BH, FALK RT, WU M, CRYSTAL RG. Clinical features and history of the destructive lung disease associated with alpha-1-antitrypsin deficiency of adults with pulmonary symptoms. *Am Rev Respir Dis* 1988, 138:327-336.
  40. ERIKSSON S. Studies in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand Suppl* 1965, 432:1-85.
  41. ALVAREZ-GRANDA L, CABERO-PEREZ MJ, BUSTAMANTE-RUIZ A, GONZALEZ-LAMUÑO D, DELGADO-RODRIGUEZ M, GARCÍA-FUENTES M. PI SZ phenotype in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1997, 52:659-661.
  42. COX DW, HOEPPNER VH, LEVISON H. Protease inhibitors in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the alpha-antitrypsin heterozygote controversy. *Am Rev Respir Dis* 1976, 113:601-606.
  43. LIEBERMAN J, WINTER B, SASTRE A. Alpha 1-antitrypsin Pi-types in 965 COPD patients. *Chest* 1986, 89:370-373.
  44. SANDFORD AJ, WEIR TD, SPINELLI JJ, PARÉ PD. Z and S mutations of the alpha1-antitrypsin gene and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999, 20:287-291.
  45. TARJÁN E, MAGYAR P, VÁCZI Z, LANTOS A, VASZÁR L. Longitudinal lung function study in heterozygous PiMZ phenotype subjects. *Eur Respir J* 1994, 7:2199-2204.
  46. DAHL M, TYBJAERG-HANSEN A, LANGE P, VESTBO J, NORDESTGAARD BG. Change in lung function and morbidity from chronic obstructive pulmonary disease in alpha1-antitrypsin MZ heterozygotes: A longitudinal study of the general population. *Ann Intern Med* 2002, 136:270-279.
  47. SANDFORD AJ, CHAGANI T, WEIR TD, CONNETT JE, ANTHONISEN NR, PARÉ PD. Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163:469-473.
  48. SILVA GE, SHERRILL DL, GUERRA S, BARBEE RA. A longitudinal study of alpha1-antitrypsin phenotypes and decline in FEV1 in a community population. *Chest* 2003, 123:1435-1440.
  49. KIM CH, YIM JJ, YOO CG, LEE CT, KIM YW, HAN SK, et al. Alpha-antitrypsin genotypes in Korean patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 2005, 10:223-228.

- 
50. BRANTLY ML, WITTES JT, VOGELMEIER CF, HUBBARD RC, FELLS GA, CRYSTAL RG. Use of a highly purified alpha 1-antitrypsin standard to establish ranges for the common normal and deficient alpha 1-antitrypsin phenotypes. *Chest* 1991, 100:703-708.
  51. MORGAN K, SCOBIE G, KALSHEKER NA. Point mutation in a 3' flanking sequence of the alpha-1-antitrypsin gene associated with chronic respiratory disease occurs in a regulatory sequence. *Hum Mol Genet* 1993, 2:253-257.
  52. POLLER W, MEISEN C, OLEK K. DNA polymorphisms of the alpha 1-antitrypsin gene region in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Clin Invest* 1990, 20:1-7.
  53. KALSHEKER NA, WATKINS GL, HILL S, MORGAN K, STOCKLEY RA, FICK RB. Independent mutations in the flanking sequence of the alpha-1-antitrypsin gene are associated with chronic obstructive airways disease. *Dis Markers* 1990, 8:151-157.
  54. SANDFORD AJ, SPINELLI JJ, WEIR TD, PARÉ PD. Mutation in the 3' region of the alpha-1-antitrypsin gene and chronic obstructive pulmonary disease. *J Med Genet* 1997, 34:874-875.
  55. CHAPPELL S, DALY L, MORGAN K, GUETTA BARANES T, ROCA J, RABINOVICH R, et al. Cryptic haplotypes of SERPINA1 confer susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Mutat* 2006, 27:103-109.
  56. POLLER W, FABER JP, WEIDINGER S, TIEF K, SCHOLZ S, FISCHER M, et al. A leucine-to-proline substitution causes a defective alpha 1-antichymotrypsin allele associated with familial obstructive lung disease. *Genomics* 1993, 17:740-743.
  57. POLLER W, FABER JP, SCHOLZ S, WEIDINGER S, BARTHOLOMÉ K, OLEK K, et al. Mis-sense mutation of alpha 1-antichymotrypsin gene associated with chronic lung disease. *Lancet* 1992, 339:1538.
  58. SANDFORD AJ, CHAGANI T, WEIR TD, PARÉ PD. Alpha 1-antichymotrypsin mutations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Dis Markers* 1998, 13:257-260.
  59. SAMILCHUK EI, CHUCHALIN AG. Mis-sense mutation of alpha 1-antichymotrypsin gene and chronic lung disease. *Lancet* 1993, 342:624.
  60. ISHII T, MATSUSE T, TERAMOTO S, MATSUI H, HOSOI T, FUKUCHI Y, et al. Association between alpha-1-antichymotrypsin polymorphism and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Clin Invest* 2000, 30:543-548.
  61. POLLER W, FABER JP, KLOBECK G, OLEK K. Cloning of the human alpha 2-macroglobulin gene and detection of mutations in two functional domains: the bait region and the thiolester site. *Hum Genet* 1992, 88:313-319.
  62. POLLER W, BARTH J, VOSS B. Detection of an alteration of the alpha 2-macroglobulin gene in a patient with chronic lung disease and serum alpha 2-macroglobulin deficiency. *Hum Genet* 1989, 83:93-96.
  63. DEMEO DL, MARIANI TJ, LANGE C, SRISUMA S, LITONJUA AA, CELEDON JC, et al. The SERPINE2 gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum Genet* 2006, 78:253-264.
  64. ZHU G, WARREN L, APONTE J, GULSVIK A, BAKKE P, ANDERSON WH, et al. The SERPINE2 gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease in two large populations. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176:167-173.
  65. CHAPPELL S, DALY L, MORGAN K, BARANES TG, ROCA J, RABINOVICH R, et al. The SERPINE2 gene and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum Genet* 2006, 79:184-186.

- 
66. MERCER B, BRINCKERHOFF C, D'ARMIENTO J. Activation of the MMP-1 promoter by cigarette smoke in human small airway epithelial cells requires ERK MAP kinase signaling: differential response of the 1G and 2G promoter sequences. *Proc Am Thorac Soc* 2006, 3:477.
  67. JOOS L, HE JQ, SHEPHERDSON MB, CONNETT JE, ANTHONISEN NR, PARÉ PD, et al. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet* 2002, 11:569-576.
  68. KORYTINA GF, AKHMADISHINA LZ, IANBAEVA DG, VIKTOROVA TV. Polymorphism in promoter regions of matrix metalloproteinases (MMP1, MMP9, and MMP12) in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Genetika* 2008, 44:242-249.
  69. TESFAIGZI Y, MYERS OB, STIDLEY CA, SCHWALM K, PICCHI M, CROWELL RE, et al. Genotypes in matrix metalloproteinase 9 are a risk factor for COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2006, 1:267-278.
  70. HIRANO K, SAKAMOTO T, UCHIDA Y, MORISHIMA Y, MASUYAMA K, ISHII Y, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001, 18:748-752.
  71. HEGAB AE, SAKAMOTO T, UCHIDA Y, NOMURA A, ISHII Y, MORISHIMA Y, et al. Association analysis of tissue inhibitor of metalloproteinase2 gene polymorphisms with COPD in Egyptians. *Respir Med* 2005, 99:107-110.
  72. HEGAB AE, SAKAMOTO T, UCHIDA Y, NOMURA A, ISHII Y, MORISHIMA Y, et al. Promoter activity of human tissue inhibitor of metalloproteinase 2 gene with novel single nucleotide polymorphisms. *Respirology* 2005, 10:27-30.
  73. SMITH CA, HARRISON DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997, 350:630-633.
  74. XIAO D, WANG C, DU MJ, PANG BS, ZHANG HY, XIAO B, et al. Relationship between polymorphisms of genes encoding microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase P1 and chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J (Engl)* 2004, 117:661-667.
  75. HERSH CP, DEMEO DL, LAZARUS R, CELEDÓN JC, RABY BA, BENDITT JO, et al. Genetic association analysis of functional impairment in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 173:977-984.
  76. SANDFORD AJ, CHAGANI T, WEIR TD, CONNETT JE, ANTHONISEN NR, PARÉ PD. Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163:469-473.
  77. VIBHUTI A, ARIF E, DEEPAK D, SINGH B, QADAR PASHA MA. Genetic polymorphisms of GSTP1 and mEPHX correlate with oxidative stress markers and lung function in COPD. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 359:136-142.
  78. YIM JJ, PARK GY, LEE CT, KIM YW, HAN SK, SHIM YS, et al. Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Koreans: combined analysis of polymorphic genotypes for microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase M1 and T1. *Thorax* 2000, 55:121-125.
  79. TAKEYABU K, YAMAGUCHI E, SUZUKI I, NISHIMURA M, HIZAWA N, KAMAKAMI Y. Gene polymorphism for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema in a Japanese population. *Eur Respir J* 2000, 15:891-894.

80. FU WP, SUN C, DAI LM, YANG LF, ZHANG YP. Relationship between COPD and polymorphisms of HOX-1 and mEPH in a Chinese population. *Oncol Rep* 2007, 17:483-488.
81. HERSH CP, DEMEO DL, LANGE C, LITONJUA AA, REILLY JJ, KWIATKOWSKI D, et al. Attempted replication of reported chronic obstructive pulmonary disease candidate gene associations. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005, 33:71-78.
82. DEMEO DL, HERSH CP, HOFFMAN EA, LITONJUA AA, LAZARUS R, SPARROW D, et al. Genetic determinants of emphysema distribution in the national emphysema treatment trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176:42-48.
83. BRØGGER J, STEEN VM, EIKEN HG, GULSVIK A, BAKKE P. Genetic association between COPD and polymorphisms in TNF, ADRB2 and EPHX1. *Eur Respir J* 2006, 27:682-688.
84. SUNDBERG K, JOHANSSON AS, STENBERG G, WIDERSTEN M, SEIDEL A, MANNERVIK B, et al. Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 1998, 19:433-436.
85. ISHII T, MATSUSE T, TERAMOTO S, MATSUI H, MIYAO M, HOSOI T, et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999, 54:693-696.
86. HE JQ, RUAN J, CONNETT JE, ANTHONISEN NR, PARÉ PD, SANDFORD AJ. Antioxidant gene polymorphisms and susceptibility to a rapid decline in lung function in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166:323-328.
87. YIM JJ, YOO CG, LEE CT, KIM YW, HAN SK, SHIM YS. Lack of association between glutathione S-transferase P1 polymorphism and COPD in Koreans. *Lung* 2002, 180:119-125.
88. CHAN-YEUNG M, HO SP, CHEUNG AH, SO LK, WONG PC, CHAN KK, et al. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes and functional activity in smokers with or without COPD. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007, 11:508-514.
89. HARRISON DJ, CANTLAY AM, RAE F, LAMB D, SMITH CA. Frequency of glutathione S-transferase M1 deletion in smokers with emphysema and lung cancer. *Hum Exp Toxicol* 1997, 16:356-360.
90. ZIDZIK J, SLABÁ E, JOPPA P, KLUCHOVÁ Z, DORKOVÁ Z, SKYBA P, et al. Glutathione S-transferase and microsomal epoxide hydrolase gene polymorphisms and risk of chronic obstructive pulmonary disease in Slovak population. *Croat Med J* 2008, 49:182-191.
91. HE JQ, CONNETT JE, ANTHONISEN NR, PARÉ PD, SANDFORD AJ. Glutathione S-transferase variants and their interaction with smoking on lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 170:388-394.
92. IMBODEN M, DOWNS SH, SENN O, MATYAS G, BRÄNDLI O, RUSSI EW, et al. Glutathione S-transferase genotypes modify lung function decline in the general population: SAPALDIA cohort study. *Respir Res* 2007, 8:2.
93. YAMADA N, YAMAYA M, OKINAGA S, NAKAYAMA K, SEKIZAWA K, SHIBAHARA S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 2000, 66:187-195.
94. FU WP, ZHAO ZH, FANG LZ, SUN C, LIU L, ZHANG JQ, et al. Heme oxygenase-1 polymorphism associated with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J* 2007, 120:12-16.

- 
95. GUÉNÉGOU A, LEYNAERT B, BÉNESSIANO J, PIN I, DEMOLY P, NEUKIRCH F, et al. Association of lung function decline with the heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism in a general population sample. Results from the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS), France. *J Med Genet* 2006, 43:e43.
  96. HSIEH MH, CHONG IW, HWANG JJ, LEE CH, HO CK, YU ML, et al. Lack of associations between several polymorphisms in cytokine genes and the risk of chronic obstructive pulmonary diseases in Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci* 2008, 24:126-137.
  97. HEGAB AE, SAKAMOTO T, SAITOH W, NOMURA A, ISHII Y, MORISHIMA Y, et al. Polymorphisms of TNFalpha, IL1beta, and IL1RN genes in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 329:1246-1252.
  98. TANAKA G, SANDFORD AJ, BURKETT K, CONNETT JE, ANTHONISEN NR, PARÉ PD, et al. Tumour necrosis factor and lymphotoxin A polymorphisms and lung function in smokers. *Eur Respir J* 2007, 29:34-41.
  99. PAPATHEODOROU A, LATSI P, VRETTOU C, DIMAKOU A, CHRONEOU A, MAKRYTHANASIS P, et al. Development of a novel microarray methodology for the study of SNPs in the promoter region of the TNF-alpha gene: their association with obstructive pulmonary disease in Greek patients. *Clin Biochem* 2007, 40:843-850.
  100. FERRAROTTI I, ZORZETTO M, BECCARIA M, GILÈ LS, PORTA R, AMBROSINO N, et al. Tumour necrosis factor family genes in a phenotype of COPD associated with emphysema. *Eur Respir J* 2003, 21:444-449.
  101. KÜÇÜKAYCAN M, VAN KRUGTEN M, PENNING S HJ, HUIZINGA TW, BUURMAN WA, DENTENER MA, et al. Tumor necrosis factor-alpha +489G/A gene polymorphism is associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2002, 3:29.
  102. PATUZZO C, GILÈ LS, ZORZETTO M, TRABETTI E, MALERBA G, PIGNATTI PF, et al. Tumor necrosis factor gene complex in COPD and disseminated bronchiectasis. *Chest* 2000, 117:1353-1358.
  103. BROEKHUIZEN R, GRIMBLE RF, HOWELL WM, SHALE DJ, CREUTZBERG EC, WOUTERS EF, et al. Pulmonary cachexia, systemic inflammatory profile, and the interleukin 1beta -511 single nucleotide polymorphism. *Am J Clin Nutr* 2005, 82:1059-1064.
  104. RUSE CE, HILL MC, TOBIN M, NEALE N, CONNOLLY MJ, PARKER SG, et al. Tumour necrosis factor gene complex polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2007, 101:340-344.
  105. WU L, CHAU J, YOUNG RP, POKORNY V, MILLS GD, HOPKINS R, et al. Transforming growth factor-beta1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2004, 59:126-129.
  106. OGAWA E, RUAN J, CONNETT JE, ANTHONISEN NR, PARÉ PD, SANDFORD AJ. Transforming growth factor-beta1 polymorphisms, airway responsiveness and lung function decline in smokers. *Respir Med* 2007, 101:938-943.
  107. ITO M, HANAOKA M, DROMA Y, HATAYAMA O, SATO E, KATSUYAMA Y, et al. The association of transforming growth factor beta 1 gene polymorphisms with the emphysema phenotype of COPD in Japanese. *Intern Med* 2008, 47:1387-1394.
  108. VAN DIEMEN CC, POSTMA DS, VONK JM, BRUINENBERG M, NOLTE IM, BOEZEN HM. Decorin and TGF-beta1 polymorphisms and development of COPD in a general population. *Respir Res* 2006, 7:89.

- 
109. YOON HI, SILVERMAN EK, LEE HW, YOO CG, LEE CT, CHUNG HS, et al. Lack of association between COPD and transforming growth factor-beta1 (TGFB1) genetic polymorphisms in Koreans. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006, 10:504-509.
  110. LIEBHART J, POLAK M, DOBEK R, LIEBHART E, DOR A, KULCZAK A, et al. TGF-beta1 gene polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease. *Pneumonol Alergol Pol* 2005, 73:216-220.
  111. VAN DER POUW KRAAN TC, KÜÇÜKAYCAN M, BAKKER AM, BAGGEN JM, VAN DER ZEE JS, DENTENER MA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with the -1055 IL-13 promoter polymorphism. *Genes Immun* 2002, 3:436-439.
  112. SADEGHNEJAD A, MEYERS DA, BOTTAI M, STERLING DA, BLEECKER ER, OHAR JA. IL13 promoter polymorphism 1112C/T modulates the adverse effect of tobacco smoking on lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176:748-752.
  113. JIANG L, HE B, ZHAO MW, NING LD, LI XY, YAO WZ. Association of gene polymorphisms of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-13 with chronic obstructive pulmonary disease in Han nationality in Beijing. *Chin Med J* 2005, 118:541-547.
  114. HEGAB AE, SAKAMOTO T, SAITOH W, MASSOUD HH, MASSOUD HM, HASSANEIN KM, et al. Polymorphisms of IL4, IL13, and ADRB2 genes in COPD. *Chest* 2004, 126:1832-1839.
  115. SEIFART C, DEMPFLER A, PLAGENS A, SEIFART U, CLOSTERMANN U, MÜLLER B, et al. TNF-alpha-, TNF-beta-, IL-6-, and IL-10-promoter polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Tissue Antigens* 2005, 65:93-100.
  116. HU RC, XU YJ, ZHANG ZX, XIE JG. Polymorphism of interleukin-10 gene promoter and its association with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Chinese Han people. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2003, 20:504-507.
  117. BURGESS JL, FIERRO MA, LANTZ RC, HYSOONG TA, FLEMING JE, GERKIN R, et al. Longitudinal decline in lung function: evaluation of interleukin-10 genetic polymorphisms in firefighters. *J Occup Environ Med* 2004, 46:1013-1022.
  118. DEMEO DL, CAMPBELL EJ, BARKER AF, BRANTLY ML, EDEN E, MCELVANEY NG, et al. IL10 polymorphisms are associated with airflow obstruction in severe alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008, 38:114-120.
  119. HE JQ, SHUMANSKY K, ZHANG X, CONNETT JE, ANTHONISEN NR, SANDFORD AJ. Polymorphisms of interleukin-10 and its receptor and lung function in COPD. *Eur Respir J* 2007, 29:1120-1126.
  120. GINGO MR, SILVEIRA LJ, MILLER YE, FRIEDLANDER AL, COSGROVE GP, CHAN ED, et al. Tumour necrosis factor gene polymorphisms are associated with COPD. *Eur Respir J* 2008, 31:1005-1012.
  121. MATHESON MC, ELLIS JA, RAVEN J, WALTERS EH, ABRAMSON MJ. Association of IL8, CXCR2 and TNF-alpha polymorphisms and airway disease. *J Hum Genet* 2006, 51:196-203.
  122. SAKAO S, TATSUMI K, IGARI H, WATANABE R, SHINO Y, SHIRASAWA H, et al. Association of tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism with low attenuation areas on high-resolution CT in patients with COPD. *Chest* 2002, 122:416-420.
  123. SAKAO S, TATSUMI K, IGARI H, SHINO Y, SHIRASAWA H, KURIYAMA T. Association of tumor necrosis factor alpha gene promoter polymorphism with the presence of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163:420-422.

- 
124. KEATINGS VM, CAVE SJ, HENRY MJ, MORGAN K, O'CONNOR CM, FITZGERALD MX, et al. A polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may predispose to a poor prognosis in COPD. *Chest* 2000, 118:971-975.
  125. HUANG SL, SU CH, CHANG SC. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 156:1436-1439.
  126. ASADA M, YAMAYA M, EBIHARA S, YASUDA H, TOMITA N, KUBO H, et al. Interleukin-1beta gene polymorphisms associated with COPD. *Chest* 2005, 128:1072-1073.
  127. LEE JM, KANG YR, PARK SH, CHA SI, KIM JS, KANG HK, et al. Polymorphisms in interleukin-1B and its receptor antagonist genes and the risk of chronic obstructive pulmonary disease in a Korean population: a case-control study. *Respir Med* 2008, 102:1311-1320.
  128. BROEKHUIZEN R, GRIMBLE RF, HOWELL WM, SHALE DJ, CREUTZBERG EC, WOUTERS EF, et al. Pulmonary cachexia, systemic inflammatory profile, and the interleukin 1beta -511 single nucleotide polymorphism. *Am J Clin Nutr* 2005, 82:1059-1064.
  129. JOOS L, MCINTYRE L, RUAN J, CONNETT JE, ANTHONISEN NR, WEIR TD, et al. Association of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist haplotypes with rate of decline in lung function in smokers. *Thorax* 2001, 56:863-866.
  130. ISHII T, MATSUSE T, TERAMOTO S, MATSUI H, MIYAO M, HOSOI T, et al. Neither IL-1beta, IL-1 receptor antagonist, nor TNF-alpha polymorphisms are associated with susceptibility to COPD. *Respir Med* 2000, 94:847-851.
  131. KLEIN W, ROHDE G, ARINIR U, HAGEDORN M, DÜRIG N, SCHULTZE-WERNINGHAUS G, et al. A promotor polymorphism in the Interleukin 11 gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Electrophoresis* 2004, 25:804-808.
  132. HUANG N, LIU L, WANG XZ, LIU D, YIN SY, YANG XD. Association of interleukin (IL)-12 and IL-27 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease in a Chinese population. *DNA Cell Biol* 2008, 27:527-531.
  133. STEMMLER S, ARINIR U, KLEIN W, ROHDE G, HOFFJAN S, WIRKUS N, et al. Association of interleukin-8 receptor alpha polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Genes Immun* 2005, 6:225-230.
  134. MATHESON MC, ELLIS JA, RAVEN J, WALTERS EH, ABRAMSON MJ. Association of IL8, CXCR2 and TNF-alpha polymorphisms and airway disease. *J Hum Genet* 2006, 51:196-203.
  135. ARINIR U, KLEIN W, ROHDE G, STEMMLER S, EPPLEN JT, SCHULTZE-WERNINGHAUS G. Polymorphisms in the interleukin-8 gene in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Electrophoresis* 2005, 26:2888-2891.
  136. CÓRDOBA-LANÚS E, DE-TORRES JP, LÓPEZ-AGUILAR C, RODRÍGUEZ-PÉREZ MC, MACAMEYER N, MONTEJO-DE-GARCINI A, et al. Association of IL-6 gene polymorphisms and COPD in a Spanish population. *Respir Med* 2008, 102:1805-1811.
  137. EDDAHIBI S, CHAOUAT A, TU L, CHOUAID C, WEITZENBLUM E, HOUSSET B, et al. Interleukin-6 gene polymorphism confers susceptibility to pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006, 3:475-476.

- 
138. HSIEH MH, CHONG IW, HWANG JJ, LEE CH, HO CK, YU ML, et al. Lack of associations between several polymorphisms in cytokine genes and the risk of chronic obstructive pulmonary diseases in Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci* 2008, 24:126-137.
  139. HO LI, HARN HJ, CHEN CJ, TSAI NM. Polymorphism of the beta(2)-adrenoceptor in COPD in Chinese subjects. *Chest* 2001, 120:1493-1499.
  140. JOOS L, WEIR TD, CONNETT JE, ANTHONISEN NR, WOODS R, PARÉ PD, et al. Polymorphisms in the beta2 adrenergic receptor and bronchodilator response, bronchial hyperresponsiveness, and rate of decline in lung function in smokers. *Thorax* 2003, 58:703-707.
  141. HIZAWA N, MAKITA H, NASUHARA Y, BETSUYAKU T, ITOH Y, NAGAI K, et al. Beta2-adrenergic receptor genetic polymorphisms and short-term bronchodilator responses in patients with COPD. *Chest* 2007, 132:1485-1492.
  142. ISHII T, KEICHO N, TERAMOTO S, AZUMA A, KUDOH S, FUKUCHI Y, et al. Association of Gc-globulin variation with susceptibility to COPD and diffuse panbronchiolitis. *Eur Respir J* 2001, 18:753-757.
  143. ITO I, NAGAI S, HOSHINO Y, MURO S, HIRAI T, TSUKINO M, et al. Risk and severity of COPD is associated with the group-specific component of serum globulin 1F allele. *Chest* 2004, 125:63-70.
  144. LAUFS J, ANDRASON H, SIGVALDASON A, HALAPI E, THORSTEINSSON L, JÓNASSON K, et al. Association of vitamin D binding protein variants with chronic mucus hypersecretion in Iceland. *Am J Pharmacogenomics* 2004, 4:63-68.
  145. SCHELLENBERG D, PARÉ PD, WEIR TD, SPINELLI JJ, WALKER BA, SANDFORD AJ. Vitamin D binding protein variants and the risk of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157(3 Pt 1):957-961.
  146. HORNE SL, COCKCROFT DW, DOSMAN JA. Possible protective effect against chronic obstructive airways disease by the GC2 allele. *Hum Hered* 1990, 40:173-176.
  147. KAUFFMANN F, KLEISBAUER JP, CAMBON-DE-MOUZON A, MERCIER P, CONSTANS J, BLANC M, et al. Genetic markers in chronic air-flow limitation. A genetic epidemiologic study. *Am Rev Respir Dis* 1983, 127:263-269.
  148. ZERVOU MI, TZORTZAKI EG, MAKRIS D, GAGA M, ZERVAS E, ECONOMIDOU E, et al. Differences in microsatellite DNA level between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006, 28:472-478.
  149. SIAFAKAS NM, TZORTZAKI EG, SOURVINOS G, BOUROS D, TZANAKIS N, KAFATOS A, et al. Microsatellite DNA instability in COPD. *Chest* 1999, 116:47-51.
  150. KARATZANIS AD, SAMARA KD, TZORTZAKI E, ZERVOU M, HELIDONIS ES, VELEGRAKIS GA, et al. Microsatellite DNA instability in nasal cytology of COPD patients. *Oncol Rep* 2007, 17:661-665.
  151. MAKRIS D, TZANAKIS N, DAMIANAKI A, NTAOUKAKIS E, NEOFYTOS E, ZERVOU M, et al. Microsatellite DNA instability and COPD exacerbations. *Eur Respir J* 2008, 32:612-618.
  152. HASHIMOTO C, HUDSON KL, ANDERSON KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988, 52:269-279.
  153. BELVIN MP, ANDERSON KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996, 12:393-416.



- 
154. LEMAITRE B, NICOLAS E, MICHAUT L, REICHHART JM, HOFFMANN JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996, 86:973-983.
  155. MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997, 388:394-397.
  156. TAKEDA K, AKIRA S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005, 17:1-14.
  157. TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003, 21:335-76.
  158. BELL JK, MULLEN GE, LEIFER CA, MAZZONI A, DAVIES DR, SEGAL DM. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 2003, 24:528-533.
  159. ALBIGER B, DAHLBERG S, HENRIQUES-NORMARK B, NORMARK S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* 2007, 261:511-528.
  160. MIGGIN SM, O'NEILL LA. New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol* 2006, 80:220-226.
  161. VERCELLI D. Innate immunity: sensing the environment and regulating the regulators. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003, 3:343-346.
  162. PASARE C, MEDZHITOV R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003, 299:1033-1036.
  163. SCHRÖDER NW, HEINE H, ALEXANDER C, MANUKYAN M, ECKERT J, HAMANN L, et al. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *J Immunol* 2004, 173:2683-2691.
  164. FAN J, FREY RS, MALIK AB. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J Clin Invest* 2003, 112:1234-1243.
  165. SATO S, NOMURA F, KAWAI T, TAKEUCHI O, MÜHLRADT PF, TAKEDA K, et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 2000, 165:7096-7101.
  166. LEE KS, SCANGA CA, BACHELDER EM, CHEN Q, SNAPPER CM. TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to *Streptococcus pneumoniae*. *Cell Immunol* 2007, 245:103-110.
  167. HADLEY JS, WANG JE, FOSTER SJ, THIEMERMANN C, HINDS CJ. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling. *Infect Immun* 2005, 73:7613-7619.
  168. ARBOUR NC, LORENZ E, SCHUTTE BC, ZABNER J, KLINE JN, JONES M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000, 25:187-191.
  169. MICHEL O, LEVAN TD, STERN D, DENTENER M, THORN J, GNAT D, et al. Systemic responsiveness to lipopolysaccharide and polymorphisms in the toll-like receptor 4 gene in human beings. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 112:923-929.
  170. CANDORE G, AQUINO A, BALISTRERI CR, BULATI M, DI CARLO D, GRIMALDI MP, et al. Inflammation, longevity, and cardiovascular diseases: role of polymorphisms of TLR4. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1067:282-287.

- 
171. LORENZ E, JONES M, WOHLFORD-LENANE C, MEYER N, FREES KL, ARBOUR NC, et al. Genes other than TLR4 are involved in the response to inhaled LPS. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001, 281:L1106-L1114.
  172. LUNDBERG A, WIKBERG LA, ILONEN J, VAARALA O, FAGERÅS BÖTTCHER M. Lipopolysaccharide induced immune responses in relation to TLR4 Asp299Gly gene polymorphism. *Clin Vaccine Immunol* 2008. [Epub ahead of print].
  173. VAN DER GRAAF C, KULLBERG BJ, JOOSTEN L, VERVER-JANSEN T, JACOBS L, VAN DER MEER JW, et al. Functional consequences of the Asp299Gly Toll-like receptor-4 polymorphism. *Cytokine* 2005, 30:264-268.
  174. VON AULOCK S, SCHRÖDER NW, GUEINZIUS K, TRAUB S, HOFFMANN S, GRAF K, et al. Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood. *J Infect Dis* 2003, 188:938-943.
  175. ERRIDGE C, STEWART J, POXTON IR. Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling. *J Exp Med* 2003, 197:1787-1791.
  176. LORENZ E, MIRA JP, FREES KL, SCHWARTZ DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002, 162:1028-1032.
  177. AGNESE DM, CALVANO JE, HAHM SJ, COYLE SM, CORBETT SA, CALVANO SE, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002, 186:1522-1525.
  178. CHILD NJ, YANG IA, PULLETZ MC, DE COURCY-GOLDER K, ANDREWS AL, PAPPACHAN VJ, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 and the systemic inflammatory response syndrome. *Biochem Soc Trans* 2003, 31(Pt 3):652-653.
  179. MONTES AH, ASENSI V, ALVAREZ V, VALLE E, OCAÑA MG, MEANA A, et al. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2006, 143:404-413.
  180. GAO HK, ZHOU ZG, LI Y, CHEN YQ. Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with an increased risk of pancreatic necrotic infection in acute pancreatitis: a study in the Chinese population. *Pancreas* 2007, 34:295-298.
  181. GENC MR, VARDHANA S, DELANEY ML, ONDERDONK A, TUOMALA R, NORWITZ E, et al; MAP STUDY GROUP. Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004, 116:152-156.
  182. KINANE DF, SHIBA H, STATHOPOULOU PG, ZHAO H, LAPPIN DF, SINGH A, et al. Gingival epithelial cells heterozygous for Toll-like receptor 4 polymorphisms Asp299Gly and Thr399ile are hyporesponsive to *Porphyromonas gingivalis*. *Genes Immun* 2006, 7:190-200.
  183. HAWN TR, VERBON A, JANER M, ZHAO LP, BEUTLER B, ADEREM A. Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:2487-2489.

- 
184. READ RC, PULLIN J, GREGORY S, BORROW R, KACZMARSKI EB, DI GIOVINE FS, et al. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2001, 184:640-642.
  185. EVERETT B, CAMERON B, LI H, VOLLMER-CONNA U, DAVENPORT T, HICKIE I, et al. Polymorphisms in Toll-like receptors-2 and -4 are not associated with disease manifestations in acute Q fever. *Genes Immun* 2007, 8:699-702.
  186. JESSEN KM, LINDBOE SB, PETERSEN AL, EUGEN-OLSEN J, BENFIELD T. Common TNF-alpha, IL-1 beta, PAI-1, uPA, CD14 and TLR4 polymorphisms are not associated with disease severity or outcome from Gram negative sepsis. *BMC Infect Dis* 2007, 7:108.
  187. TAL G, MANDELBERG A, DALAL I, CESAR K, SOMEKH E, TAL A, et al. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis* 2004, 189:2057-2063.
  188. MANDELBERG A, TAL G, NAUGOLNY L, CESAR K, ORON A, HOURI S, et al. Lipopolysaccharide hyporesponsiveness as a risk factor for intensive care unit hospitalization in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Immunol* 2006, 144:48-52.
  189. AWOMOYI AA, RALLABHANDI P, POLLIN TI, LORENZ E, SZTEIN MB, BOUKHVALOVA MS, et al. Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children. *J Immunol* 2007, 179:3171-3177.
  190. PAULUS SC, HIRSCHFELD AF, VICTOR RE, BRUNSTEIN J, THOMAS E, TURVEY SE. Common human Toll-like receptor 4 polymorphisms--role in susceptibility to respiratory syncytial virus infection and functional immunological relevance. *Clin Immunol* 2007, 123:252-257.
  191. INOUE Y, SHIMOJO N, SUZUKI Y, CAMPOS ALBERTO EJ, YAMAIDE A, SUZUKI S, et al. CD14 -550 C/T, which is related to the serum level of soluble CD14, is associated with the development of respiratory syncytial virus bronchiolitis in the Japanese population. *J Infect Dis* 2007, 195:1618-1624.
  192. RIGOLI L, ROMANO C, CARUSO RA, LO PRESTI MA, DI BELLA C, PROCOPIO V, et al. Clinical significance of NOD2/CARD15 and Toll-like receptor 4 gene single nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008, 14:4454-4461.
  193. SILBERMINTZ A, LEVINE J, WEINSTEIN T, SILVER J. Polymorphisms in the tumor necrosis factor/lipopolysaccharides pathway in Crohn disease in the Jewish Ashkenazi population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008, 46:546-550.
  194. HSIAO CH, WEI SC, WONG JM, LAI HS, CHANG MH, NI YH. Pediatric Crohn disease: clinical and genetic characteristics in Taiwan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007, 44:342-346.
  195. RIIS L, VIND I, VERMEIRE S, WOLTERS F, KATSANOS K, POLITI P, et al; European Collaborative Study Group on Inflammatory Bowel Disease. The prevalence of genetic and serologic markers in an unselected European population-based cohort of IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007, 13:24-32.
  196. GUO QS, XIA B, JIANG Y, MORRÉ SA, CHENG L, LI J, et al. Polymorphisms of CD14 gene and TLR4 gene are not associated with ulcerative colitis in Chinese patients. *Postgrad Med J* 2005, 81:526-529.
  197. HUME GE, FOWLER EV, DOECKE J, SIMMS LA, HUANG N, PALMIERI O, et al. Novel NOD2 haplotype strengthens the association between TLR4 Asp299gly and Crohn's disease in an Australian population. *Inflamm Bowel Dis* 2008, 14:585-590.

- 
198. BROWNING BL, HUEBNER C, PETERMANN I, GEARRY RB, BARCLAY ML, SHELLING AN, et al. Has toll-like receptor 4 been prematurely dismissed as an inflammatory bowel disease gene? Association study combined with meta-analysis shows strong evidence for association. *Am J Gastroenterol* 2007, 102:2504-2512.
199. PABST S, BAUMGARTEN G, STREMMEL A, LENNARZ M, KNÜFERMANN P, GILLISSEN A, et al. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms are associated with a chronic course of sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 2006, 143:420-426.
200. SCHÜRMANN M, KWIATKOWSKI R, ALBRECHT M, FISCHER A, HAMPE J, MÜLLER-QUERNHEIM J, et al. Study of Toll-like receptor gene loci in sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 2008, 152:423-431.
201. GAZOULI M, KOUNDOURAKIS A, IKONOMOPOULOS J, GIALAFOS EJ, RAPTI A, GORGOLIS VG, et al. CARD15/NOD2, CD14, and toll-like receptor 4 gene polymorphisms in Greek patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2006, 23:23-29.
202. WIKÉN M, GRUNEWALD J, EKLUND A, WAHLSTRÖM J. Higher Monocyte Expression of TLR2 and TLR4, and Enhanced Pro-inflammatory Synergy of TLR2 with NOD2 Stimulation in Sarcoidosis. *J Clin Immunol* 2008. [Epub ahead of print].
203. PATRIGNANI P, DI FEBBO C, TACCONELLI S, MORETTA V, BACCANTE G, SCIULLI MG, et al. Reduced thromboxane biosynthesis in carriers of toll-like receptor 4 polymorphisms in vivo. *Blood* 2006, 107:3572-3574.
204. HERNESNIEMI JA, RAITAKARI OT, KÄHÖNEN M, JUONALA M, HUTRI-KÄHÖNEN N, MARNIEMI J, et al. Toll-like receptor 4 gene (Asp299Gly) polymorphism associates with carotid artery elasticity. The cardiovascular risk in young Finns study. *Atherosclerosis* 2008, 198:152-159.
205. EDFELDT K, BENNET AM, ERIKSSON P, FROSTEGÅRD J, WIMAN B, HAMSTEN A, et al. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2004, 25:1447-1453.
206. HOMMELS MJ, KROON AA, NETEA MG, DE LEEUW PW, BRUGGEMAN CA, LEINER T, et al. The Asp299Gly Toll - like receptor 4 polymorphism in advanced aortic atherosclerosis. *Neth J Med* 2007, 65:203-207.
207. MORANGE PE, TIRET L, SAUT N, LUC G, ARVEILER D, FERRIERES J, et al; PRIME STUDY GROUP. TLR4/Asp299Gly, CD14/C-260T, plasma levels of the soluble receptor CD14 and the risk of coronary heart disease: The PRIME Study. *Eur J Hum Genet* 2004, 12:1041-1049.
208. YANG IA, HOLLOWAY JW, YE S; SOUTHAMPTON ATHEROSCLEROSIS STUDY (SAS) GROUP. TLR4 Asp299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. *Atherosclerosis* 2003, 170:187-190.
209. KOCH W, HOPPMANN P, PFEUFER A, SCHÖMIG A, KASTRATI A. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: no association in a Caucasian population. *Eur Heart J* 2006, 27:2524-2529.
210. NETEA MG, HIJMANS A, VAN WISSEN S, SMILDE TJ, TRIP MD, KULLBERG BJ, et al. Toll-like receptor-4 Asp299Gly polymorphism does not influence progression of atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 2004, 34:94-99.

211. LABRUM R, BEVAN S, SITZER M, LORENZ M, MARKUS HS. Toll receptor polymorphisms and carotid artery intima-media thickness. *Stroke* 2007, 38:1179-1184.
212. PIERANGELI SS, VEGA-OSTERTAG ME, RASCHI E, LIU X, ROMAY-PENABAD Z, DE MICHELI V, et al. Toll-like receptor and antiphospholipid mediated thrombosis: in vivo studies. *Ann Rheum Dis* 2007, 66:1327-1333.
213. SPELETAS M, LIADAKI K, KALALA F, DAIYOU C, KATODRITOU E, MANDALA E, et al. TLR4 single nucleotide polymorphisms and thrombosis risk in patients with myeloproliferative disorders. *Thromb Res* 2008, 122:27-32.
214. SANTINI D, ANGELETTI S, RUZZO A, DICUONZO G, GALLUZZO S, VINCENZI B, et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in gastric cancer of intestinal and diffuse histotypes. *Clin Exp Immunol* 2008, 154:360-364.
215. GARZA-GONZALEZ E, BOSQUES-PADILLA FJ, MENDOZA-IBARRA SI, FLORES-GUTIERREZ JP, MALDONADO-GARZA HJ, PEREZ-PEREZ GI. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer* 2007, 7:70-74.
216. KIM JK. Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes. *Cell Metab* 2006, 4:417-419.
217. KOLEK MJ, CARLQUIST JF, MUHLESTEIN JB, WHITING BM, HORNE BD, BAIR TL, et al. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am Heart J* 2004, 148:1034-1040.
218. RUDOLFSKY G JR, REISMANN P, WITTE S, HUMPERT PM, ISERMANN B, CHAVAKIS T, et al. Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the TLR4 gene are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004, 27:179-183.
219. KILDING R, AKIL M, TILL S, AMOS R, WINFIELD J, ILES MM, et al. A biologically important single nucleotide polymorphism within the toll-like receptor-4 gene is not associated with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003, 21:340-342.
220. LAMB R, ZEGGINI E, THOMSON W, DONN R. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005, 64:767-769.
221. SÁNCHEZ E, OROZCO G, LÓPEZ-NEVOT MA, JIMÉNEZ-ALONSO J, MARTÍN J. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2004, 63:54-57.
222. RADSTAKE TR, FRANKE B, HANSSEN S, NETEA MG, WELSING P, BARRERA P, et al. The Toll-like receptor 4 Asp299Gly functional variant is associated with decreased rheumatoid arthritis disease susceptibility but does not influence disease severity and/or outcome. *Arthritis Rheum* 2004, 50:999-1001.
223. ROELOFS MF, WENINK MH, TOONEN EJ, COENEN MJ, JOOSTEN LA, VAN DEN BERG WB, et al. The functional variant (Asp299gly) of toll-like receptor 4 (TLR4) influences TLR4-mediated cytokine production in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2008, 35:558-561.
224. TANG SC, LATHIA JD, SELVARAJ PK, JO DG, MUGHAL MR, CHENG A, et al. Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp Neurol* 2008, 213:114-121.

225. JIN JJ, KIM HD, MAXWELL JA, LI L, FUKUCHI K. Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2008, 5:23.
226. MINORETTI P, GAZZARUSO C, VITO CD, EMANUELE E, BIANCHI M, COEN E, et al. Effect of the functional toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism on susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2006, 391:147-149.
227. FOLWACZNY M, GLAS J, TÖRÖK HP, LIMBERSKY O, FOLWACZNY C. Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 2004, 135:330-335.
228. IZAKOVICOVA HOLLA L, BUCKOVA D, FASSMANN A, ROUBALIKOVA L, VANEK J. Lack of association between chronic periodontitis and the Toll-like receptor 4 gene polymorphisms in a Czech population. *J Periodontal Res* 2007, 42:340-344.
229. EMINGIL G, BERDELI A, BAYLAS H, SAYGAN BH, GÜRKAN A, KÖSE T, et al. Toll-like receptor 2 and 4 gene polymorphisms in generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2007, 78:1968-1977.
230. IMAMURA Y, FUJIGAKI Y, OOMORI Y, KUNO T, OTA N, WANG PL. Polymorphism of genes encoding toll-like receptors and inflammatory cytokines in periodontal disease in the Japanese population. *J Int Acad Periodontol* 2008, 10:95-102.
231. ZHU G, LI C, CAO Z, CORBET EF, JIN L. Toll-like receptors 2 and 4 gene polymorphisms in a Chinese population with periodontitis. *Quintessence Int* 2008, 39:217-226.
232. SCHRÖDER NW, MEISTER D, WOLFF V, CHRISTAN C, KANER D, HABAN V, et al. Chronic periodontal disease is associated with single-nucleotide polymorphisms of the human TLR-4 gene. *Genes Immun* 2005, 6:448-451.
233. JAMES JA, POULTON KV, HAWORTH SE, PAYNE D, MCKAY IJ, CLARKE FM, et al. Polymorphisms of TLR4 but not CD14 are associated with a decreased risk of aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007, 34:111-117.
234. METHE H, ZIMMER E, GRIMM C, NABAUER M, KOGLIN J. Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. *Transplantation* 2004, 78:1324-1331.
235. PALMER SM, BURCH LH, DAVIS RD, HERCZYK WF, HOWELL DN, REINSMOEN NL, et al. The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 168:628-632.
236. PALMER SM, BURCH LH, TRINDADE AJ, DAVIS RD, HERCZYK WF, REINSMOEN NL, et al. Innate immunity influences long-term outcomes after human lung transplant. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 171:780-785.
237. PALMER SM, BURCH LH, MIR S, SMITH SR, KUO PC, HERCZYK WF, et al. Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the development of rejection after renal transplantation. *Clin Transplant* 2006, 20:30-36.
238. DUCLOUX D, DESCHAMPS M, YANNARAKI M, FERRAND C, BAMOULID J, SAAS P, et al. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int* 2005, 67:2454-2461.
239. NOGUEIRA E, OZAKI KS, MACUSSO GD, QUARIM RF, CÂMARA NO, PACHECO-SILVA A. Incidence of donor and recipient toll-like receptor-4 polymorphisms in kidney transplantation. *Transplant Proc* 2007, 39:412-414.

- 
240. EID AJ, BROWN RA, PAYA CV, RAZONABLE RR. Association between toll-like receptor polymorphisms and the outcome of liver transplantation for chronic hepatitis C virus. *Transplantation* 2007, 84:511-516.
241. LORENZ E, SCHWARTZ DA, MARTIN PJ, GOOLEY T, LIN MT, CHIEN JW, et al. Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001, 7:384-387.
242. BOCHUD PY, CHIEN JW, MARR KA, LEISENRING WM, UPTON A, JANER M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2008, 359:1766-1777.
243. SANTIN I, CASTELLANOS-RUBIO A, HUALDE I, CASTAÑO L, VITORIA JC, BILBAO JR. Toll-like receptor 4 (TLR4) gene polymorphisms in celiac disease. *Tissue Antigens* 2007, 70:495-498.
244. CARVALHO A, PASQUALOTTO AC, PITZURRA L, ROMANI L, DENNING DW, RODRIGUES F. Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 2008, 197:618-621.
245. RABY BA, KLIMECKI WT, LAPRISE C, RENAUD Y, FAITH J, LEMIRE M, et al. Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166:1449-1456.
246. SMIT LA, BONGERS SI, RUVEN HJ, RIJKERS GT, WOUTERS IM, HEEDERIK D, et al. Atopy and new-onset asthma in young Danish farmers and CD14, TLR2, and TLR4 genetic polymorphisms: a nested case-control study. *Clin Exp Allergy* 2007, 37:1602-1608.
247. WERNER M, TOPP R, WIMMER K, RICHTER K, BISCHOF W, WJST M, et al. TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 112:323-330.
248. YANG IA, BARTON SJ, RORKE S, CAKEBREAD JA, KEITH TP, CLOUGH JB, et al. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. *Genes Immun* 2004, 5:41-45.
249. FAGERÅS BÖTTCHER M, HMANI-AIFA M, LINDSTRÖM A, JENMALM MC, MAI XM, NILSSON L, et al. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 114:561-567.
250. SAÇKESEN C, KARAASLAN C, KESKIN O, TOKOL N, TAHAN F, CIVELEK E, et al. The effect of polymorphisms at the CD14 promoter and the TLR4 gene on asthma phenotypes in Turkish children with asthma. *Allergy* 2005, 60:1485-1492.
251. ADJERS K, KARJALAINEN J, PESSI T, EKLUND C, HURME M. Epistatic effect of TLR4 and IL4 genes on the risk of asthma in females. *Int Arch Allergy Immunol* 2005, 138:251-256.
252. SENTHILSELVAN A, RENNIE D, CHÉNARD L, BURCH LH, BABIUK L, SCHWARTZ DA, et al. Association of polymorphisms of toll-like receptor 4 with a reduced prevalence of hay fever and atopy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008, 100:463-468.
253. LORENZ E, HALLMAN M, MARTTILA R, HAATAJA R, SCHWARTZ DA. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatr Res* 2002, 52:373-376.
254. REY G, SKOWRONEK F, ALCIATURI J, ALONSO J, BERTONI B, SAPIRO R. Toll receptor 4 Asp299Gly polymorphism and its association with preterm birth and premature rupture of membranes in a South American population. *Mol Hum Reprod* 2008, 14:555-559.

- 
255. FERRAND PE, FUJIMOTO T, CHENNATHUKUZH V, PARRY S, MACONES GA, SAMMEL M, et al. The CARD15 2936insC mutation and TLR4 896 A>G polymorphism in African Americans and risk of preterm premature rupture of membranes (PPROM). *Mol Hum Reprod* 2002, 8:1031-1034.
256. HÄRTEL CH, FINAS D, AHRENS P, KATTNER E, SCHAIBLE T, MÜLLER D, et al. Polymorphisms of genes involved in innate immunity: association with preterm delivery. *Mol Hum Reprod* 2004, 10:911-915.
257. MOLVAREC A, JERMENDY A, KOVÁCS M, PROHÁSZKA Z, RIGÓ J JR. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and preeclampsia: lack of association in a Caucasian population. *Hypertens Res* 2008, 31:859-864.
258. MOURA SB, ALMEIDA LR, GUERRA JB, ROCHA GA, CAMARGOS ROCHA AM, MELO FF, et al. Toll-like receptor (TLR2, TLR4 and TLR5) gene polymorphisms and Helicobacter pylori infection in children with and without duodenal ulcer. *Microbes Infect* 2008, [Epub ahead of print].
259. HOFNER P, GYULAI Z, KISS ZF, TISZAI A, TISZLAVICZ L, TÓTH G, et al. Genetic polymorphisms of NOD1 and IL-8, but not polymorphisms of TLR4 genes, are associated with Helicobacter pylori-induced duodenal ulcer and gastritis. *Helicobacter* 2007, 12:124-131.
260. TREJO-DE LA O A, TORRES J, PEREZ-RODRIGUEZ M, CAMORLINGA-PONCE M, LUNA LF, ABDO-FRANCIS JM, et al. TLR4 single-nucleotide polymorphisms alter mucosal cytokine and chemokine patterns in Mexican patients with Helicobacter pylori-associated gastroduodenal diseases. *Clin Immunol* 2008, 129:333-340.
261. LORENZ E, MIRA JP, CORNISH KL, ARBOUR NC, SCHWARTZ DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 2000, 68:6398-6401.
262. MOORE CE, SEGAL S, BERENDT AR, HILL AV, DAY NP. Lack of association between Toll-like receptor 2 polymorphisms and susceptibility to severe disease caused by Staphylococcus aureus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004, 11:1194-1197.
263. VON AULOCK S, SCHRÖDER NW, TRAUB S, GUEINZIUS K, LORENZ E, HARTUNG T, et al. Heterozygous toll-like receptor 2 polymorphism does not affect lipoteichoic acid-induced chemokine and inflammatory responses. *Infect Immun* 2004, 72:1828-1831.
264. OGUS AC, YOLDAS B, OZDEMIR T, UGUZ A, OLCEN S, KESER I, et al. The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J* 2004, 23:219-223.
265. LYKOURAS D, SAMPSONAS F, KAPARIANOS A, KARKOULIAS K, TSOUKALAS G, SPIROPOULOS K. Human genes in TB infection: their role in immune response. *Monaldi Arch Chest Dis* 2008, 69:24-31.
266. STRAPAGIEL D, KASZTALSKA K, DRUSZCZYŃSKA M, KOWALEWICZ-KULBAT M, VRBA A, MATUSIAK A, et al. Monocyte response receptors in BCG driven delayed type hypersensitivity to tuberculin. *Folia Histochem Cytobiol* 2008, 46:353-359.
267. SCHRÖDER NW, DITERICH I, ZINKE A, ECKERT J, DRAING C, VON BAEHR V, et al. Heterozygous Arg753Gln polymorphism of human TLR-2 impairs immune activation by Borrelia burgdorferi and protects from late stage Lyme disease. *J Immunol* 2005, 175:2534-2540.
268. KUTUKCULER N, YENIAY BS, AKSU G, BERDELI A. Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor-2 gene in children with recurrent febrile infections. *Biochem Genet* 2007, 45:507-514.



- 
269. KIJPITTAYARIT S, EID AJ, BROWN RA, PAYA CV, RAZONABLE RR. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 2007, 44:1315-1320.
270. WOEHRLE T, DU W, GOETZ A, HSU HY, JOOS TO, WEISS M, et al. Pathogen specific cytokine release reveals an effect of TLR2 Arg753Gln during Candida sepsis in humans. *Cytokine* 2008, 41:322-329.
271. KESH S, MENSAH NY, PETERLONGO P, JAFFE D, HSU K, VAN DEN BRINK M, et al. TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 2005, 1062:95-103.
272. ZAFRA G, FLÓREZ O, MORILLO CA, ECHEVERRÍA LE, MARTÍN J, GONZÁLEZ CI. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, 103:27-30.
273. MAILAPARAMBIL B, KRUEGER M, HEINZE J, FORSTER J, HEINZMANN A. Polymorphisms of toll like receptors in the genetics of severe RSV associated diseases. *Dis Markers* 2008, 25:59-65.
274. AHMAD-NEJAD P, MRABET-DAHBI S, BREUER K, KLOTZ M, WERFEL T, HERZ U, et al. The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2004, 113:565-567.
275. MRABET-DAHBI S, DALPKE AH, NIEBUHR M, FREY M, DRAING C, BRAND S, et al. The Toll-like receptor 2 R753Q mutation modifies cytokine production and Toll-like receptor expression in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008, 121:1013-1019.
276. WEIDINGER S, NOVAK N, KLOPP N, BAURECHT H, WAGENPFEIL S, RUMMLER L, et al. Lack of association between Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms and atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 2006, 118:277-279.
277. FRANSSON M, ADNER M, ERJEFÄLT J, JANSSON L, UDDMAN R, CARDELL LO. Up-regulation of Toll-like receptors 2, 3 and 4 in allergic rhinitis. *Respir Res* 2005, 6:100.
278. KORMANN MS, DEPNER M, HARTL D, KLOPP N, ILLIG T, ADAMSKI J, et al. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008, 122:86-92.
279. SMIT LA, BONGERS SI, RUVEN HJ, RIJKERS GT, WOUTERS IM, HEEDERIK D, et al. Atopy and new-onset asthma in young Danish farmers and CD14, TLR2, and TLR4 genetic polymorphisms: a nested case-control study. *Clin Exp Allergy* 2007, 37:1602-1608.
280. LACHHEB J, DHIFALLAH IB, CHELBI H, HAMZAOUI K, HAMZAOUI A. Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children. *Tissue Antigens* 2008, 71:417-425.
281. VELTKAMP M, WIJNEN PA, VAN MOORSEL CH, RIJKERS GT, RUVEN HJ, HERON M, et al. Linkage between Toll-like receptor (TLR) 2 promotor and intron polymorphisms: functional effects and relevance to sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 2007, 149:453-462.
282. LEE PL, WEST C, CRAIN K, WANG L. Genetic polymorphisms and susceptibility to lung disease. *J Negat Results Biomed* 2006, 5:5.
283. HAMANN L, GOMMA A, SCHRÖDER NW, STAMME C, GLAESER C, SCHULZ S, et al. A frequent toll-like receptor (TLR)-2 polymorphism is a risk factor for coronary restenosis. *J Mol Med* 2005, 83:478-485.

- 
284. BALISTRERI CR, CANDORE G, MIRABILE M, LIO D, CAIMI G, INCALCATERRA E, et al. TLR2 and age-related diseases: potential effects of Arg753Gln and Arg677Trp polymorphisms in acute myocardial infarction. *Rejuvenation Res* 2008, 11:293-296.
285. KOMATSUDA A, WAKUI H, IWAMOTO K, OZAWA M, TOGASHI M, MASAI R, et al. Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2008, 152:482-487.
286. RABE KF, HURD S, ANZUETO A, BARNES PJ, BUIST SA, CALVERLEY P, et al. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176:532-555.
287. AMERICAN THORACIC SOCIETY. Standardization of Spirometry, 1994 Update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 152:1107-1136.
288. LORENZ E, FREES KL, SCHWARTZ DA. Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR. *Biotechniques* 2001, 31:22-24.
289. SCHRÖDER NW, HERMANN C, HAMANN L, GÖBEL UB, HARTUNG T, SCHUMANN RR. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol Med* 2003, 81:368-372.
290. SILVERMAN EK, PALMER LJ. Case-control association studies for the genetics of complex respiratory diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000, 22:645-648.
291. WANG X, MOSER C, LOUBOUTIN JP, LYSENKO ES, WEINER DJ, WEISER JN, et al. Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J Immunol* 2002, 168:810-815.
292. LEE JS, FREVERT CW, MATUTE-BELLO G, WURFEL MM, WONG VA, LIN SM, et al. TLR-4 pathway mediates the inflammatory response but not bacterial elimination in *E. coli* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, 289:L731-L738.
293. DOZ E, NOULIN N, BOICHOT E, GUENON I, FICK L, LE BERT M, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J Immunol* 2008, 180:1169-1178.
294. HASDAY JD, BASCOM R, COSTA JJ, FITZGERALD T, DUBIN W. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest* 1999, 115:829-835.
295. ZHANG X, SHAN P, JIANG G, COHN L, LEE PJ. Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. *J Clin Invest* 2006, 116:3050-3059.
296. ROHDE G, KLEIN W, ARINIR U, HAGEDORN M, DUEBIG N, T BAUER T, et al. Association of the ASP299GLY TLR4 polymorphism with COPD. *Respir Med* 2006, 100:892-896.
297. SABROE I, WHYTE MK, WILSON AG, DOWER SK, HUBBARD R, HALL I. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms and COPD. *Thorax* 2004, 59:81.
298. GAZOULI M, MANTZARIS G, KOTSINAS A, ZACHARATOS P, PAPALAMBROS E, ARCHIMANDRITIS A, et al. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005, 11:681-685.

- 
299. KIECHL S, LORENZ E, REINDL M, WIEDERMANN CJ, OBERHOLLENZER F, BONORA E, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002, 347:185-192.
300. TÖRÖK HP, GLAS J, TONENCHI L, MUSSACK T, FOLWACZNY C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2004, 112:85-91.
301. KNAPP S, WIELAND CW, VAN 'T VEER C, TAKEUCHI O, AKIRA S, FLORQUIN S, et al. Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *J Immunol* 2004, 172:3132-3138.
302. PABST S, YENICE V, LENNARZ M, TULETA I, NICKENIG G, GILLISSEN A, et al. Toll-Like Receptor 2 Gene Polymorphisms Arg677Trp and Arg753Gln in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Lung* 2009, [Epub ahead of print].
303. MALLIA P, JOHNSTON SL. Mechanisms and experimental models of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Proc Am Thorac Soc* 2005, 2:361-366.